

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 950 901**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/10
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2015 PCT/US2015/059613**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16073949**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2015 E 15856496 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2023 EP 3215172**

(54) Título: **Modificaciones y utilizaciones de péptidos de conotoxina**

(30) Prioridad:

07.11.2014 US 201462123123 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2023

(73) Titular/es:

**KINETA CHRONIC PAIN, LLC. (100.0%)
219 Terry Avenue North, Suite 300
Seattle, Washington 98109, US**

(72) Inventor/es:

POSAKONY, JEFFREY, JERARD

(74) Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 950 901 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

Modificaciones y utilizaciones de péptidos de conotoxina

5 CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

[0001] La divulgación describe de manera general secuencias modificadas de péptidos de conotoxina, composiciones farmacéuticas de péptidos de conotoxina y su uso en el tratamiento de dolor y otros trastornos.

10 ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

[0002] Los caracoles marinos depredadores del género Conus contienen venenos que son ricos en péptidos activos neurofarmacológicamente (péptidos de conotoxina o proteínas de caracoles como «CSP»). Existen aproximadamente 500 especies en Conus, y entre aquellos que han sido examinados hasta ahora, una característica conservada es la presencia de péptidos de α -conotoxina en su veneno. Los péptidos de α -conotoxina nativos son péptidos reticulados con alto contenido de disulfuro con enlaces de disulfuro C1-C3 y C2-C4.

[0003] Debido a alta variabilidad de secuencias de sus residuos de no cisteína, α -conotoxinas son extremadamente distintas y cada especie de Conus posee un complemento único de péptidos de α -conotoxina. Los péptidos de α -conotoxina se sintetizan como precursores grandes, y la toxina madura se genera mediante una escisión proteolítica hacia el extremo C-terminal del precursor. A diferencia de las secuencias de intercisteína variables de las toxinas maduras, los precursores y los genes que los codifican son bastante conservadores tanto entre péptidos de α -conotoxina en una especie determinada de Conus como entre una especie y la otra.

[0004] Se ha demostrado que de manera general los péptidos de α -conotoxina son los agonistas del receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (nAChR) (McIntosh, et al., 1999; Janes, 2005; Dutton et al., 2001; Arias et al., 2000). nAChRs son un grupo de canales iónicos cerrados de acetilcolina que forman parte de la superfamilia de canales iónicos cerrados de ligando. Son pentámeros de subunidades de transmembrana que rodean un canal que dirige iones centrales. Se han identificado muchas subunidades diferentes y la mayoría se encajan en dos subfamilias principales (subunidades α y subunidades β). Los subunidades pueden aliarse en diferentes combinaciones en los pentámeros del receptor, generando una familia diversa de subtipos de receptores. La mayoría de los subtipos contienen subunidades tanto de las familias de subunidades α como β . Por ejemplo, el subtipo de músculo adulto humano contiene dos subunidades α y una subunidad β (además de una subunidad δ y una ϵ), y el subtipo del sistema nervioso central $\alpha_4\beta_2$ se compone de subunidades α_4 y β_2 . Los ejemplos de nAChRs que se componen solamente de subunidades α son los subtipos α_7 y α_9 (homopentámeros) y los subtipos $\alpha_9\alpha_{10}$ (un α heteropentámero total). El análisis filogenético muestra que las subunidades α_7 , α_9 y α_{10} se relacionan más estrechamente entre sí que con otras subunidades de nAChR.

[0005] Las subunidades de nAChR α_9 y α_{10} se expresan en diferentes tejidos. En el oído interno nAChRs $\alpha_9\alpha_{10}$ median la transmisión sináptica entre fibras olivociliares eferentes y células ciliadas cocleares. Las subunidades α_9 y α_{10} también se encuentran en neuronas ganglionares de la raíz dorsal, linfocitos, queratinocitos de la piel y la pars tuberalis de la hipófisis. Además, la subunidad nAChR α_9 está activa en cáncer de pecho. Péptido de α -conotoxina RgIA (SEQ ID NO: 1) ha demostrado que bloqueaba $\alpha_9\alpha_{10}$ nAChR (Ellison, et al., 2006). Determinados análogos de RgIA han demostrado también que bloqueaban $\alpha_9\alpha_{10}$ nAChR tal como se demostró en US 2009/0203616, US 2012/0220539 y WO 2008/011006.

[0006] Kowalczyk et al. (2012, Bioorg. Med. Chem., 20(8):2661-2668) se refiere a la síntesis y la evaluación de miméticos de amilina-(1-8) como agentes para tratar osteoporosis.

[0007] Hargittai et al. (2000, J. Med. Chem., 43(25):4787-4792) se refiere a la síntesis química y las actividades biológicas de análogos de lactama de α -conotoxina SI, y da a conocer la síntesis de cuatro análogos del regiosímero natural de α -conotoxina SI.

[0008] Holland-Nell et al. (2011, Angew. Chem. Int. Ed., 50(22):5204-5206) enseña el uso de triazoles como miméticos de enlaces de disulfuro para generar un efecto estabilizador. Específicamente, da conocer el potencial del uso de triazoles como miméticos funcionales de enlaces de disulfuro de origen natural múltiples en péptidos biológicamente activos.

[0009] Ward et al. (2013, Mol. Metab., 2(4):468-479) se refiere a la lipidación de péptidos para la estabilización de proteínas para potenciar su función biológica. De manera particular, enseña el uso de lipidación para lograr una farmacología específica.

[0010] Harris y Chess (2003, Nat. Rev. Drug. Discov., 2(3):214-221) es una revisión del efecto de PEGilación sobre fármacos y como la PEGilación a menudo puede llevar a fármacos más eficaces y seguros con conveniencia y conformidad mejorados para pacientes.

[0011] Armishaw et al. (2006, J. Biol. Chem., 281(20):14136-14143) se refiere a una nueva clase de antagonistas del receptor nicotínico neuronal $\alpha 7$ potente, α -selenoconotoxinas, y demuestra que las selenoconotoxinas pueden utilizarse como andamiajes altamente estables en el diseño de nuevos fármacos.

5 [0012] Dekan et al. (2011, J. Am. Chem. Soc., 133(40):15866-15869) se refiere al reemplazo de los dos enlaces de disulfuro nativos en α -conotoxina Iml con tioéteres de cistationina estables en redox isostéricos.

[0013] Brady et al. (2013, Marine Drugs, 11(7):2293-2313) proporciona un resumen de toxinas de péptidos, en particular, conotoxinas, como ejemplos atractivos para el desarrollo terapéutico. Una estrategia divulgada es la creación de un peptidomimético indicando los residuos claves para crear el farmacóforo de la toxina de péptido en un andamiaje no peptídico, creando un peptidomimético.

[0014] Green et al. (2012, Chemistry and Biology, Current Biology, 14(4):399-407) se refiere a una exploración del concepto de andamiajes ricos en disulfuro que consisten en polímeros isósteros y farmacóforos peptídicos. Se utilizaron los espaciadores flexibles para reemplazar partes limitadas de manera conformacional de una conotoxina con tres puentes de disulfuro, SIIA, para formar híbridos de péptido-polímero, denominados polítidos.

[0015] Veronese y Pasut (2005, Drug Discovery Today, 10(21): 1451-1458) se refiere al uso de PEGilación con el fin de administrar un fármaco, potenciando el potencial de péptidos y proteínas como agentes terapéuticos.

[0016] El documento EP 1834952 A1 se refiere a toxinas botulínicas modificadas que tienen mayor estabilidad y, por consiguiente, duración terapéutica prolongada en comparación con toxinas botulínicas originales correspondientes. Adicionalmente se refiere a ácidos nucleicos que codifican composiciones farmacéuticas que contienen dichas toxinas botulínicas modificadas.

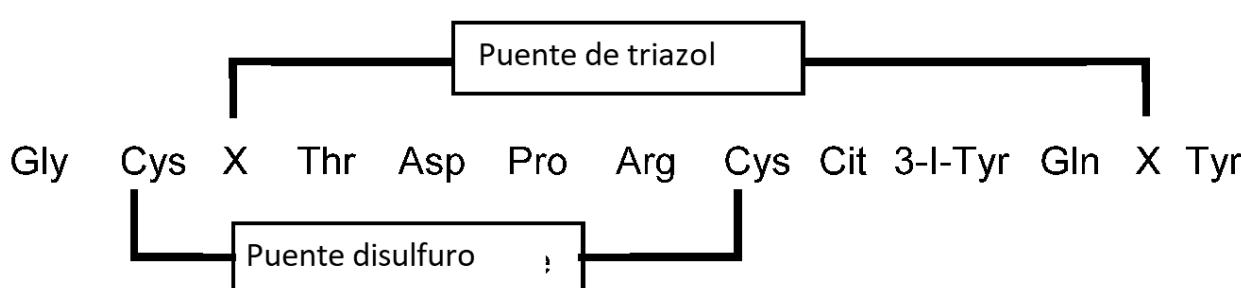
[0017] Qian et al. (2013, International Journal of Pharmaceutics, 454(1):553-558) enseña un estrategia de PEGilación de sitio específico realizada en un análogo de exendina-4 (Ex4C) a través de un procedimiento de maleimida, la caracterización de dicho análogo y la determinación del sitio de PEGilación.

[0018] El documento US 2012/0220539 A1 se refiere a péptidos de conotoxina que son análogos del péptido de α -conotoxina RgIA, que se puede utilizar en el tratamiento de dolor y trastornos inflamatorios y en el tratamiento de cáncer de pecho.

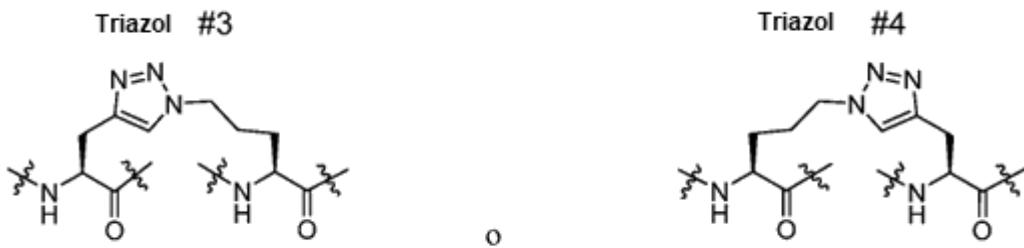
[0019] De manera general, el potencial terapéutico de candidatos de fármaco peptídico se puede mejorar o mediante la formulación o mediante su modificación química no covalente o covalente. La utilización práctica de péptidos como terapéuticos se ha limitado por la solubilidad relativa baja y estabilidad fisicoquímica, tanto en formulaciones como productos farmacológicos como *in vivo* después de la administración a un animal o un humano. Los fármacos peptídicos parenterales, en particular, se eliminan rápidamente de la circulación mediante la filtración renal o el sistema reticuloendotelial. A menudo son susceptibles a degradación rápida por proteasas circulantes. Finalmente, los péptidos pueden ser inmunogénicos lo que puede limitar su uso terapéutico debido al riesgo de eliminación por anticuerpos o, en algunos casos, incidencia de reacciones inflamatorias (por ejemplo, reacciones similares a anafilácticas). Adicionalmente, la administración oral de péptidos se dificulta por la insuficiencia de transportadores de péptidos especializados en los intestinos que facilitan la absorción de péptidos con longitudes superiores a 2-4 aminoácidos, así como la dificultad de paso a través del ambiente con pH bajo del estómago.

CARACTERÍSTICAS DE LA DIVULGACIÓN

[0020] La presente invención proporciona un péptido de conotoxina que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se indica a continuación:



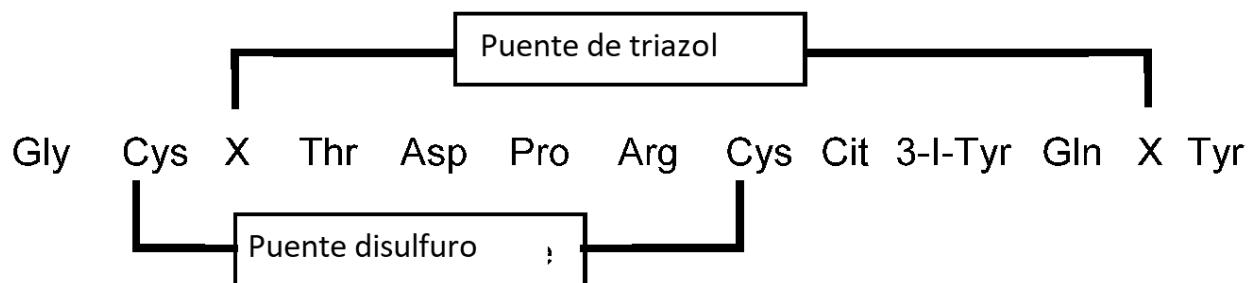
en el que cada X representa un residuo de cisteína reemplazado por (S)-propargil glicina o (S)-azidonorvalina; en el que el puente de triazol es



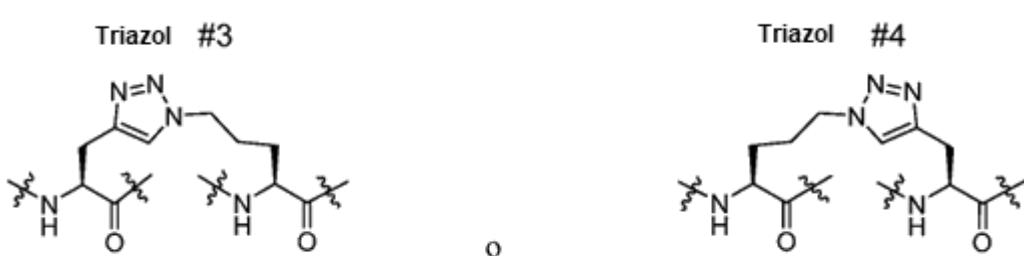
en el que el extremo C-terminal del péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida; o una variante del mismo con como mínimo un 90 % de identidad de secuencia, como mínimo un 95 % de identidad de secuencia, como mínimo un 96 % de identidad de secuencia, como mínimo un 97 % de identidad de secuencia, como mínimo un 98 % de identidad de secuencia, o como mínimo un 99 % de identidad de secuencia; en el que la variante contiene una sustitución conservadora de aminoácidos; y en el que la variante contiene dicho puente de triazol y dicho puente disulfuro.

5 [0021] En una realización, la sustitución conservadora de aminoácidos implica una sustitución que se encuentra en el 10 grupo de sustitución conservadora que contiene aminoácidos que tienen residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr y Trp.

[0022] En una realización, el péptido de conotoxina tiene una secuencia de aminoácidos tal como se indica a continuación:



15 en el que cada X representa un residuo de cisteína reemplazado por (S)-propargil glicina o (S)-azidonorvalina; en el que el puente de triazol es



20 y en el que el extremo C-terminal del péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida.

[0023] En una realización, el péptido de conotoxina o una variante del mismo se modifica mediante la adición de una o más moléculas de poli-(etilenglicol).

25 [0024] En el presente documento se proporciona también una composición farmacéutica que comprende el péptido de conotoxina o una variante del mismo de la invención.

[0025] La presente invención proporciona también un péptido de conotoxina o una variante del mismo o una composición farmacéutica de la invención para su utilización en el tratamiento de dolor, una afección inflamatoria, dolor e inflamación, o inflamación y neuropatía.

30 [0026] En una realización, el dolor es dolor general, dolor crónico, dolor neuropático, dolor nociceptivo, dolor inflamatorio, dolor inducido por daño del nervio periférico, dolor inducido por un trastorno inflamatorio, dolor inducido por un trastorno metabólico, dolor inducido por cáncer, dolor inducido por quimioterapia, dolor inducido por un

procedimiento quirúrgico y/o dolor inducido por una quemadura.

[0027] En una realización, la afección inflamatoria es inflamación, inflamación crónica, una enfermedad reumática, sepsis, fibromialgia, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis, endometriosis, fibromas uterinos, una enfermedad inflamatoria cutánea, una afección inflamatoria de los pulmones, una enfermedad asociada a inflamación del sistema nervioso, enfermedad periodontal o enfermedad cardiovascular.

[0028] La presente divulgación hace referencia a modificaciones de péptidos de α -conotoxina que incluyen análogos de RgIA y RgIA para aumentar su potencial en el uso de terapéuticos para dolor e inflamación. Estos cambios incluyen modificaciones de aminoácidos, que tal como se utilizan en el presente documento incluyen supresiones, sustituciones y adiciones. Estos cambios incluyen también grupos o moléculas funcionales de no aminoácidos adheridos a los péptidos tales como cadenas de ácidos grasos, grupos acetilo, grupos de PEGilación y/o glicosilación. Cambios adicionales incluye análogos de RgIA modificados para contener puentes de extremo N- hacia C-terminal de glicina-alanina que ciclan de manera eficaz los péptidos. Estos enfoques aumentan propiedades similares a fármaco deseado que incluyen estabilidad de péptido *in vitro* e *in vivo*, aumentan su semivida en circulación, aumentan su biodisponibilidad oral tal como mediante simplificación de paso a través del estómago y aumento de absorción y reducen eliminación renal/hepática una vez en circulación. Estas modificaciones de análogos de péptidos de conotoxina se utilizan para bloquear el subtipo α 9 α 10 del receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (nAChR) con selectividad y afinidad muy altas y, por consiguiente, producen efectos analgésicos y antiinflamatorios en estados inflamatorios, neuropáticos, cancerígenos y otras enfermedades.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0029]

Las FIGURAS 1A-1G muestran modificaciones de RgIA para reducir la isomerización del residuo de aspartato conservado en la secuencia conservada de Asp-Pro-Arg. Isomerización se muestra en la FIGURA 1A. Modificaciones se muestran en las FIGURAS 1B-1G. FIGURA 2A y FIGURA 2B muestra estabilidad aumentada de CSP-2 (SEQ ID NO:3) y CSP-4 (SEQ ID NO:5), respectivamente, en suero después de la amidación del extremo C-terminal.

La FIGURA 2A muestra estabilidad de CSP-2 y CSP-2-NH2 en suero de rata en un periodo de tiempo de 0-2 horas; CSP-2-NH2 muestra estabilidad aumentada en comparación con CSP-2 a lo largo del tiempo. FIGURA 2B muestra estabilidad de CSP-4 y CSP-4-NH2 en suero de plasma humano (Citrato) en un periodo de tiempo de 0-24 horas; CSP-4-NH2 muestra estabilidad aumentada en comparación con CSP-4 a lo largo del tiempo. Las medidas realizadas en un periodo de tiempo=0 se tomaron 30 segundos después de mezclar péptido con suero.

Las FIGURAS 3A-3D muestran esquemas de conectividad de puentes en análogos de RgIA. X e Y representan sustitución del residuo de aminoácido con un aminoácido de origen natural o no natural en la configuración R o S (es decir, D-aminoácidos o L-aminoácidos) que, a continuación, se acoplan a la formación de puente. En SEQ ID NO:25, el aminoácido en la posición X e Y es cisteína, y el puente es un puente disulfuro. El acoplador puede ser un péptido, alcano C1-C5, dialquiléter, dialquil tioéter, etoxiéter repetitivo, alqueno; o el resto de puente se puede conectar directamente con el esqueleto del péptido. El resto de puente puede ser diseleniuro, disulfuro, anillos heterocíclicos de 5 o 6 miembros, un alqueno, enlace amida, carbamato, urea, tiourea, sulfonamida, sulfonilurea. Los ejemplos de anillos de 5 miembros incluyen 1,2-diazoles, oxazoles y tiazoles, 1,3-diazoles, oxazoles y tiazoles, 1,2,3-triazoles, 1,2,4-triazoles, tetrazoles. La conectividad a las unidades de acoplador se puede realizar a través de los átomos de anillo adyacente (es decir, 1,2-, o 1,5-) o separado por un átomo de anillo (es decir, 1,3- o 1,4-).

La FIGURA 4 muestra cuatro ejemplos de péptidos cada uno enlazado con un disulfuro de cisteína y un puente de lactama, el último basado en ácido glutámico y lisina. Los procedimientos estándares de síntesis de péptidos se utilizan para la cadena principal de péptidos; la amida de unión puede formarse de manera selectiva mediante el uso de grupos protectores ortogonales con la química empleada para la cadena principal de péptidos. X determina la sustitución del residuo de cisteína por un aminoácido de origen natural o no natural. En los cuatro ejemplos mostrados en el presente documento, la cisteína se sustituye por ácido glutámico en la posición 2 y con lisina en la posición 8 (lactama #1), la cisteína se sustituye con lisina en la posición 2 y con ácido glutámico en la posición 8 (lactama #2), la cisteína se sustituye por ácido glutámico en la posición 3 y lisina en la posición 12 (lactama #3), la cisteína se sustituye por lisina en la posición 3 y con ácido glutámico en la posición 12 (lactama #4).

La FIGURA 5 muestra dos ejemplos de péptidos unidos por un disulfuro de cisteína y un puente de triazol, el último formado a partir de reacción de cicloadición 1, 3-dipolar (es decir, «química click») a partir de aminoácidos modificados. X determina un aminoácido modificado que reemplaza un residuo de cisteína por formación con puente; en los ejemplos proporcionados anteriormente, los aminoácidos modificados son (S)-propargil glicina y (S)-azidonorvalina, los que se han acoplado para formar el anillo de 1 ,2,3-triazolo indicado.

La FIGURA 6 muestra farmacocinética de CSP-4-NH2 y análogos lipídicos de CSP-4-NH2 medidos en plasma. CSP-4-NH2 (Δ), C12-CSP-4-NH2 (O) y C16-CSP-4-NH2 (■) se administraron por la vía subcutánea a ratones (500 mg/kg). Ratones, $n=3$. Las barras de error representan Error Estándar de la Media (S.E.M.) de las tres muestras. CX-

representa una fracción lipídica de longitud X conjugada con el CSP.

Las FIGURAS 7A y 7B muestra eficacia de análogos de CSP-4-NH2 lipidados en modelo de capsaicina de dolor neuropático. La administración por la vía subcutánea de 500 mg/kg de C12-CSP-4-NH2 (FIGURA 7A) y C16-CSP-4-NH2 (FIGURA 7B) era eficaz en la reducción de hiperalgesia térmica inducida por capsaicina (prueba de Hargreaves).

5 * determina valores considerablemente distintos al vehículo. $P<0,05$. Ratas, $n=6$. Barra de errores representa S.E.M. de las seis muestras.

10 La FIGURA 8 muestra la eficacia de análogos lipidados, C12-CSP-4-NH2 en un modelo de neuropatía inducida por quimioterapia en ratas. Se redujo la hiperalgesia mecánica ($t=0$; prueba de Randal Selitto) después de una única inyección subcutánea de C12- CSP-4-NH2 (500 mg/kg) que duró 53 horas. * determina valores considerablemente distintos del tiempo 0. $P<0,05$. Ratas, $n=8$. Barra de errores representa S.E.M. de las ocho muestras.

15 La FIGURA 9 muestra el efecto farmacoterapéutico de análogo PEGilado de CSP-4-NH2 en modelo de dolor neuropático inducido por quimioterapia. PEG-SVA-CSP-4-NH2, era eficaz en la reducción de hiperalgesia (CINP)-mecánica de dolor neuropático inducido por quimioterapia ($t=0$; prueba de Randal-Selitto) después de una inyección subcutánea única de PEG-SVA- CSP-4-NH2 (500 mg/kg). El efecto duró 75 horas. * determina valores considerablemente distintos del tiempo 0. $P<0,05$. Ratas, $n=8$. Barra de errores representa S.E.M. de las ocho muestras.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0030] La presente divulgación se refiere al péptido de α -conotoxina RgIA (SEQ ID NO:1), péptidos de conotoxina que son análogos del péptido de α -conotoxina RgIA, así como las modificaciones de los mismos (de manera colectiva «análogos de RgIA» en el presente documento). Estos análogos de RgIA bloquean el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (nAChR) y se puede utilizar para tratar dolor e inflamación. Estas condiciones de dolor incluyen dolor musculoesquelético, dolor inflamatorio, dolor de cáncer, síndromes de dolor neuropático que incluyen dolor neuropático de diabetes, dolor inducido por quimioterapia, neuralgia posherpética, dolor periférico neuropático idiopático, dolor en extremidad fantasma, dolor ortopédico inducido por osteoartritis y dolor inducido de manera autoinmune/inflamación que incluye dolor de artritis reumatoide. Los análogos de RgIA pueden utilizarse también en el desarrollo adicional de fármaco tal como se describe en el presente documento.

[0031] Los caracoles marinos producen un número de péptidos que poseen efectos neurotóxicos en las presas. Los péptidos del género *Conus* oscilan típicamente entre 12 y 30 aminoácidos en su longitud y contienen 4 o más residuos de cisteína; las conotoxinas del subtipo alfa contienen y formar dos enlaces disulfuros en una conectividad de C1-C3 y C2-C4. Los péptidos de α -conotoxina unen nAChRs. Uno de estos, RgIA (SEQ ID NO: 1), es selectivos para nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ que han demostrado tener propiedades analgésicos en diferentes modelos de dolor neuropático e inflamación. Además de los residuos de cisteína conservados, el residuo de prolina se conserva también y las funciones de la región DPR en la unión al nAChRs $\alpha 9\alpha 10$. El residuo de arginina en la posición 9 se asocia con la selectividad aumentada para el nAChRs $\alpha 9\alpha 10$.

[0032] Los análogos descritos previamente (PCT/US2014/040374) de RgIA han requerido características similares a fármaco tal como afinidad aumentada para la diana de nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ humanos en comparación con el RgIA progenitor y estabilidad *in vitro* e *in vivo* aumentada (Tabla 1). Los análogos de RgIA descritos previamente también se dan a conocer en las Patentes de EE. UU. números 6.797.808; 7.279.549; 7.666.840; 7.902.153; 8.110.549; 8.487.075; y 8.735.541; y en las Solicitudes de Patente de EE. UU. 2009/0203616 y US 2012/0220539. La presente divulgación se refiere también a análogos adicionales de RgIA tal como se enumera en la Tabla 2.

[0033] La presente divulgación describe una serie de modificaciones que se pueden realizar a análogos de RgIA, que incluyen aquellos enumerados en las Tablas 1 y 2, para mejorar sus características similares a fármacos en su uso terapéutico incluyendo como analgésicos.

Tabla 1.

Análog o	Secuencia	SEQ ID NO.
CSP-P	GCCSDPRCRYRCR	1
CSP-1	GCCSDPRCRX12RCR	2
CSP-2	GCCTDPRCX11X12QCR	3
CSP-3	GCCTDPRCX11X12QCRR	4
CSP-4	GCCTDPRCX11X12QCY	5
CSP-5	GX13CTDPRX13X11X12QCR	6

ES 2 950 901 T3

CSP-6	GCCTDPRCRX12QCF	7
CSP-7	GCCTDPRCRX12QCY	8
CSP-8	GCCTDPRCRX12QCW	9
X11 = Citrulina		
X12 = 3-yodo-tirosina		
X13 = Selenocisteína		

Tabla 2.

Secuencia	SEQ ID NO.
GCCTDPRCX21X12QCYRR	222
GCCTDPRCX21X12QCRRY	223
GCCTDPRCX21X12QCF	224
GCCTDPRCX21X12QCW	225
GCCTDPRCX21X12QCYY	226
GCCTDPRCX21X12QCYR	227
GCCTDPRCRX12QCRRR	228
GCCTDPRCRX12QCYRR	229
GCCTDPRCRX12QCRRY	230
GCCTDPRCRX12QCYY	231
GCCTDPRCRX12QCYR	232
GCCSDPRCNYDHPEIC	233
GCCSDPRCNYDHPEIC-amida	234
GCCSHPACSVNHPELC	235
GCCSHPACSVNHPELC-amida	236
GCCTDPRCRYRCR	237
GCCSDX14QRCRYRCR	238
GCCTDX14RCRYRCR	239
GCCSDPRCRX15RCR	240
GCCTDPRCRX15RCR	241
X15GCCSDX14RCRX15RCR	242
X15GCCTDX14RCRX15RCR	243
GCCSDPRCX16YRCR	244
GCCSDPRCX21X12RCR	245
GX13CTDPRX13X21X12QCK	246
GX13CSDPRX13RYRCR	247
GCCTDPRCX21X12RCR	248
GCCSDPRCX21YRCR	249
GCCSDPRCRYQCR	250
GCCSDPRCFWRCR	251
GX17CSDPRCRYRCR	252
GCCADPRCRYRCR	253

ES 2 950 901 T3

GCCYDPRCRYRCR	254
GCCSDPRX17RYRCR	255
GCCSDPRCGYRCR	256
GCCSDPRCAYRCR	257
GCCSDPRCVYRCR	258
GCCSDPRCLYRCR	259
GCCSDPRCIYRCR	260
GCCSDPRCMYRCR	261
GCCSDPRCFYRCR	262
GCCSDPRCWYRCR	263
GCCSDPRCPYRCR	264
GCCSDPRCSYRCR	265
GCCSDPRCTYRCR	266
GCCSDPRCCYRCR	267
GCCSDPRCYRCR	268
GCCSDPRCNYRCR	269
GCCSDPRCQYRCR	270
GCCSDPRCDYRCR	271
GCCSDPRCEYRCR	272
GCCSDPRCKYRCR	273
GCCSDPRCHYRCR	274
GCCSDPRCRFRCR	275
GCCSDPRCRYHCR	276
GCCSDPRCX18X12RCR	277
GCCSDPRCRYRC	278
GCCSEPRCRYRCR	279
GCCSDVRCRYRCR	280
GCCSDPRCAYRCR	281
GCCSHPACRYRCR	282
GCCSDPRCX19YRCR	283
ACCSDRRCRWRC	284
FDGRNAPADDKASDLIAQIVRRACCSDRRCRWRCG	285
X15GCCSX14RCRX15RCR	286
SNKRKNAAMLDIAQHAIRGCCSDPRCRYRCR	287
DECCSNPACRVNNPHV	288
SDGRNVAAKAFHRIGRTIRDECCSNPACRVNNPHVCRR	289
DECCSNPACRLNNPHACRR	290
DX20CCSNPACRLNNPHACRR	291
DECCSNX14ACRLNNPHACRR	292
X20DX20CCSNX14ACRLNNPHACRR	293

DECCSNPACRLNNX14HACRRR	294
X20DX20CCSNPACRLNX14HACRRR	295
DECCSNX14ACRLNNX14HACRRR	296
X20DX20CCSNX14ACRLNNX14HACRRR	297
DECCSNPACRLNNPHVCRRR	298
DX20CCSNPACRLNNPHVCRRR	299
DECCSNX20ACRLNNPHVCRRR	300
X20DX20CCSNX14ACRLNPVCRRR	301
DECCSNPACRLNNX14HVCRRR	302
X20DX20CCSNX14ACRLNNPHVCRRR	303
DECCSNX14ACRLNNX14HVCRRR	304
X20DX20CCSNX14ACRLNNX14HVCRRR	305
GCCSHPACNVDHPEIC	306
MFTVFLVVLA TATTVSFTSDRAFRGRNSAANDK RSDLAA LSVRRGCCSHPACSVNHP ELCGRRR	307
ECCTNPVCHAEHQHELCARRR	308
ECCTNPVCHAX21HQELCARRR	309
ECCTNPVCHAX21HQX21LCARRR	310
ECCTNPVCHAX12HQX21LCARRR	311
X21CCTNPVCHAEHQHELCARRR	312
X21CCTNPVCHAX21HQELCARRR	313
X21CCTNPVCHAX21HQX21LCARRR	314
X21CCTNPVCHAX12HQX21LCARRR	315
GCCSHPVCSAMSPIC	316
GCCSHPVCSAMSX1IC	317
GCCSHX14VCSAMSX1IC	318
GCCSHX14VCSAMSPIC	319
X1 = des-X1, Arg o citrulina X11 = Citrulina X12 = 3-yodo-tirosina X13 = Selenocisteína X14 = hidroxi-Pro X15 = mono-halo Tyr que incluye yodo-Tir, bromo-Tyr X16 = homo-Arg u ornitina X17 = homocisteína X18 = omega-nitro-Arg X19 = D-Arg X20 = γ -carboxi-Glu (Gla) X21 = 7-carboxi-Glu	

[0034] En diferentes aspectos, los análogos de RglA descritos en el presente documento tienen la fórmula X10 X6 X7 X3 D P R X8 X1 X12 X4 X9 X5 (SEQ ID NO:10), en donde X1 es des-X1, Arg o citrulina; X3 es des-X3, Ser, o Thr; X4 es des-X4, Arg o Gln; X5 es des-X5, Arg, Tyr, Phe, Trp, Tyr-Tyr, Tyr-Arg, Arg-Arg-Arg, Arg-Arg, Arg-Tyr, Arg-Arg-Tyr, o Tyr-Arg-Arg; X6 es des-X6, Cys, o selenocisteína; X7 es des-X7, Cys, o selenocisteína; X8 es des-X8, Cys, o selenocisteína; X9 es des-X9, Cys, o selenocisteína; y X10 es des-X10 o Gly. En una realización, X10 es Gly, X6 es

Cys o selenocisteína, X7 es Cys, X3 es Ser o Thr; X8 es Cys o selenocisteína, X1 es Arg o citrulina, X4 es Arg o Gln, X9 es Cys, y X5 es Arg, Tyr, Phe, Trp, o Arg-Arg-Arg (SEQ ID NO:11). En una realización, X10 es Gly, X6 es Cys o selenocisteína, X7 es Cys, X3 es Thr, X8 es Cys o selenocisteína, X1 es Arg o citrulina, X4 es Gin, X9 es Cys, y X5 es Arg o Tyr (SEQ ID NO:12).

- 5 [0035] En diferentes realizaciones las modificaciones del RglA y sus análogos se llevan a cabo para prevenir la isomerización del residuo de aspartato conservado a isoaspartato en la secuencia de tripéptido conservada «Asp-Pro-Arg». Esta isomerización se muestra en la FIGURA 1A. Este enfoque impide esta isomerización y da como resultado análogos de RglA estables para mantener sus propiedades farmacológicas de alta afinidad y alta selectividad en la unión a la diana deseada, concretamente nAChRs α9α10. Por consiguiente, a pesar del tamaño globular pequeño de péptidos de conotoxina de RglA, las sustituciones de enlace de péptido y las estrategias propuestas presentadas por el presente documento dan como resultado péptidos bioactivos, potentes y más estables. Se utilizan y se evalúan tres enfoques químicos diferentes. En la primera instrucción, el ácido aspártico se sustituye por aminoácido malónico (FIGURA 1B; 2-aminoácido propanodióico), que es equivalente a un ácido aspártico con una cadena lateral acortada. 10 Este derivado con la cadena lateral acortada no puede formar intermediario de anhídrido de ácido succínico de 5 miembros que es necesario para la producción del isómero. Se puede lograr la síntesis a través de química de péptidos estándar utilizando un aminoácido malónico adecuadamente protegido (por ejemplo, FIGURA 1C).
- 15 [0036] En las dos instrucciones siguientes, un enlace de no péptido se diseña para unir la sustitución de ácido aspártico y la prolina a través de N-alquilación de la prolina; ambos ejemplos son no hidrolizables y, por consiguiente, no son sensibles a la isomerización.
- 20 [0037] El segundo enfoque reemplaza el grupo carbonilo con cadena de péptido de ácido aspártico con un grupo metileno (FIGURA 1D) para proporcionar un «enlace de péptido reducido». Esto se puede preparar mediante la alquilación de la prolina con un reemplazo de Asp protegida de manera apropiada tal como ácido (3S)-4-bromo-3-[[1,1-dimetiletoxi)carbonil]amino]-butanoico (FIGURA 1E) que en sí se incorpora en la cadena de péptidos a través de química de péptidos estándar.
- 25 [0038] El tercer enfoque reemplaza el grupo carbonilo con cadena de péptido de ácido aspártico con un grupo cetometilo (FIGURA 1F) que en sí es equivalente de la inserción de un grupo metileno en la cadena de péptidos entre Asp y Pro. Esto se puede preparar mediante la alquilación de la prolina con un reemplazo de Asp protegida de manera apropiada tal como 1,1-dimetiletil-(3S)-5- cloro-4-oxo-3-[[fenilmetoxi)carbonil]amino]-pentanoato (FIGURA 1G) que en sí se incorpora en la cadena de péptidos a través de química de péptidos estándar.
- 30 [0039] Por ejemplo, las modificaciones de aminoácidos pueden aumentar la estabilidad de péptidos mediante la sustitución de residuos de aminoácidos que pueden ser propensos a escisión enzimática. Tales modificaciones incluyen: sustitución de cualquier L-aminoácido con el D-aminoácido correspondiente; la sustitución de Gly por un aminoácido neutral, que incluye Val, Nor-Val, Leu o Ile; la sustitución de Arg por His o Lys; la sustitución de Pro por Gly; la sustitución de Gly por Pro y/o la sustitución de cisteína por selenocisteína. Las secuencias de péptidos ilustrativas con tales modificaciones se describen en la Tabla 3.
- 35
- 40

Tabla 3. Secuencias de péptidos modificados con modificaciones de aminoácidos

Secuencia	SEQ ID NO.
GCCSDPRCRYRCH	30
GCCSDPRCRYRCK	31
GCCSDPRCRX22RCR	32
X23CCSDPRCRYRCR	33
X24CCSDPRCRYRCR	34
GCCSDX25RCRYRCR	35
GCCSX26PRCRYRCR	36
GCCSDPX27CRYRCR	37
GCCSX26X25RCRYRCR	38
GCCSDX25X27CRYRCR	39
GCCSX26X25X27CRYRCR	40
GCCSDPRCRYHCR	41
GCCSDPRCRYKCR	42

ES 2 950 901 T3

PCCSDPRCRYRCR	43
GCCSDPRCRX12RCH	44
GCCSDPRCRX12RCK	45
GCCSDPRCRX22RCH	46
X23CCSDPRCRX12RCR	47
X24CCSDPRCRX12RCR	48
GCCSDX25RCRX12RCR	49
GCCSX26PRCRX12RCR	50
GCCSDPX27CRX12RCR	51
GCCSX26X25RCRX12RCR	52
GCCSDX25X27CRX12RCR	53
GCCSX26X25X27CRX12RCR	54
GCCSDPRCRX12HCR	55
GCCSDPRCRX12KCR	56
PCCSDPRCRX12RCR	57
GCCSDPRCHX12RCR	58
GCCSDPRCKX12RCR	59
GCCTDPRCRX12RCH	60
GCCTDPRCRX12RCK	61
GCCTDPRCRX22RCR	62
X23CCTDPRCRX12RCR	63
X24CCTDPRCRX12RCR	64
GCCTDX25RCRX12RCR	65
GCCTX26PRCRX12RCR	66
GCCTDPX27CRX12RCR	67
GCCTX26X25RCRX12RCR	68
GCCTDX25X27CRX12RCR	69
GCCTX26X25X27CRX12RCR	70
GCCTDPRCRX12HCR	71
GCCTDPRCRX12KCR	72
PCCTDPRCRX12RCR	73
GCCTDPRCHX12RCR	74
GCCTDPRCKX12RCR	75
GCCTDPRCX11X12QCHRR	76
GCCTDPRCX11X12QCKRR	77
GCCTDPRCX11X12QCRHR	78
GCCTDPRCX11X12QCRKR	79
GCCTDPRCX11X12QCRRH	80
GCCTDPRCX11X12QCRRK	81
GCCTDPRCX11X22QCRRR	82

ES 2 950 901 T3

X23CCTDPRCX11X12QCRRR	83
X24CCTDPRCX11X12QCRRR	84
GCCTDX25RCX11X12QCRRR	85
GCCTX26PRCX11X12QCRRR	86
GCCTDPX27CX11X12QCRRR	87
GCCTX26X25RCX11X12QCRRR	88
GCCTDX25X27CX11X12QCRRR	89
GCCTX26X25X27CX11X12QCRRR	90
PCCTDPRCX11X12QCRRR	91
GCCTDPRCX11X22QCY	92
GCCTDPRCX11X12QCX22	93
X23CCTDPRCX11X12QCY	94
X24CCTDPRCX11X12QCY	95
GCCTDX25RCX11X12QCY	96
GCCTX26PRCX11X12QCY	97
GCCTDPX27CX11X12QCY	98
GCCTX26X25RCX11X12QCY	99
GCCTDX25X27CX11X12QCY	100
GCCTX26X25X27CX11X12QCY	101
PCCTDPRCX11X12QCY	102
GX13CTDPRX13X11X12QCH	103
GX13CTDPRX13X11X12QCK	104
GX13CTDPRX13X11X22QCR	105
X23X13CTDPRX13X11X12QCR	106
X24X13CTDPRX13X11X12QCR	107
GX13CTDX25RX13X11X12QCR	108
GX13CTX26PRX13X11X12QCR	109
GX13CTDPX27X13X11X12QCR	110
GX13CTX26X25RX13X11X12QCR	111
GX13CTDX25X27X13X11X12QCR	112
GX13CTX26X25X27X13X11X12QCR	113
PX13CTDPRX13X11X12QCR	114
GCCTDPRCRX22QCF	115
X23CCTDPRCRX12QCF	116
X24CCTDPRCRX12QCF	117
GCCTDX25RCRX12QCF	118
GCCTX26PRCRX12QCF	119
GCCTDPX27CRX12QCF	120
GCCTX26X25RCRX12QCF	121
GCCTDX25X27CRX12QCF	122

ES 2 950 901 T3

GCCTX26X25X27CRX12QCF	123
PCCTDPRCRX12QCF	124
GCCTDPRCRX22QCY	125
GCCTDPRCRX12QCX22	126
X23CCTDPRCRX12QCY	127
X24CCTDPRCRX12QCY	128
GCCTDX25RCRX12QCY	129
GCCTX26PRCRX12QCY	130
GCCTDPX27CRX12QCY	131
GCCTX26X25RCRX12QCY	132
GCCTDX25X27CRX12QCY	133
GCCTX26X25X27CRX12QCY	134
PCCTDPRCRX12QCY	135
GCCTDPRCRX22QCW	136
X23CCTDPRCRX12QCW	137
X24CCTDPRCRX12QCW	138
GCCTDX25RCRX12QCW	139
GCCTX26PRCRX12QCW	140
GCCTDPX27CRX12QCW	141
GCCTX26X25RCRX12QCW	142
GCCTDX25X27CRX12QCW	143
GCCTX26X25X27CRX12QCW	144
PCCTDPRCRX12QCW	145
GX13CTDPRCX11X12QCY	146
GCX13TDPRCX11X12QCY	147
GCCTDPRX13X11X12QCY	148
GCCTDPRCX11X12QX13Y	149
GX13CTDPRX13X11X12QCY	150
GCX13TDPRCX11X12QX13Y	151
GX13X13TDPRCX11X12QCY	152
GCCTDPRX13X11X12QX13Y	153
GX13CTDPRCX11X12QX13Y	154
GX13X13TDPRX13X11X12QCY	155
GCX13TDPRX13X11 X12QX13Y	156
GX13CTDPRX13X11X12QX13Y	157
GX13X13TDPRCX11 X12QX13Y	158
GX13X13TDPRX13X11X12QX13Y	159
GX13CTDPRCRX12QCY	160
GCX13TDPRCRX12QCY	161
GCCTDPRX13RX12QCY	162

GCCTDPRCRX12QX13Y	163
GX13CTDPRX13RX12QCY	164
GCX13TDPRCRX12QX13Y	165
GX13X13TDPRCRX12QCY	166
GCCTDPRX13RX12QX13Y	167
GX13CTDPRCRX12QX13Y	168
GX13X13TDPRX13RX12QCY	169
GCX13TDPRX13RX12QX13Y	170
GX13CTDPRX13RX12QX13Y	171
GX13X13TDPRCRX12QX13Y	172
GX13X13TDPRX13RX12QX13Y	173
11 = Citrulina	
X12 = 3-yodo-tirosina	
X13 = Selenocisteína	
X14 = hidroxi-Pro	
X15 = mono-halo Tyr que incluye yodo-Tir, bromo-Tyr	
X16 = homo-Arg u ornitina	
X17 = homocisteína	
X18 = omega-nitro-Arg	
X19 = D-Arg	
X20 = γ -carboxi-Glu (Gla)	
X21 = 7-carboxi-Glu	
X22 = O-fosfo-Tyr, O-sulfo-Tyr, u O-fluoro-Tyr X23 = mono-fluoro-Glicina	
X24 = di-fluoro-Glicina	
X25 = D-Pro	
X26 = D-Asp	
X27 = D-Arg	

[0040] En diferentes aspectos, se añaden enlazadores a péptidos análogos de RglA que utilizan química de péptidos estándar. La adición de uno o más enlazadores alrededor de regiones conservadas que se ha demostrado que estén involucrados en el reconocimiento de diana aumenta la estabilidad y la afinidad de unión de análogos de RglA. Las secuencias de péptidos ilustrativas con tales cambios se describen en la Tabla 4.

5

Tabla 4. Secuencias de péptidos con la adición de enlazadores

Secuencia	SEQ ID NO.
X10X6X7X3[AEA]DPRX8X1X2X4X9X5	174
X10X6X7X3D[AEA]PRX8X1X2X4X9X5	175
X10X6X7X3DP[AEA]RX8X1X2X4X9X5	176
X10X6X7X3DPR[AEA]X8X1X2X4X9X5	177
X10X6X7X3[AEEA]DPRX8X1X2X4X9X5	178
X10X6X7X3D[AEEA]PRX8X1X2X4X9X5	179
X10X6X7X3DP[AEEA]RX8X1X2X4X9X5	180
X10X6X7X3DPR[AEEA]X8X1X2X4X9X5	181
X10X6X7X3[AEEEEA]DPRX8X1X2X4X9X5	182
X10X6X7X3D[AEEEEA]PRX8X1X2X4X9X5	183

X10X6X7X3DP[AEEEA]RX8X1X2X4X9X5	184
X10X6X7X3DPR[AEEEA]X8X1X2X4X9X5	185
<p>X1 = des-X1, Arg, citrulina o ω-nitro-Arg X2 = des-X2, Tyr, o mono-yodo-Tyr X3 = des-X3, Ser, o Thr X4 = des-X4, Arg o Gln X5 = des-X5, Arg, Tyr, fenilalanina (Phe o F), triptófano (Trp o W), Tyr-Tyr, Tyr-Arg, Arg-Arg-Arg, Arg-Arg, Arg- Tyr, Arg-Arg-Tyr o Tyr-Arg-Arg X6 = des-X6, Cys o selenocisteína X7 = des-X7, Cys o selenocisteína X8 = des-X8, Cys o selenocisteína X9 = des-X9, Cys o selenocisteína X10 = des-X10 o Gly AEA = ácido 2-amino etoxiacético AEEA = ácido 2-[2-[etoxi]etoxi]acético AESEA = ácido 2-[2-[2-[etoxi]etoxi]etoxi]acético </p>	

[0041] En diferentes realizaciones los análogos de RglA pueden tener una modificación del extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal. Tales modificaciones incluyen: acilación del extremo N-terminal Gly y/o amidación del extremo C-terminal (Tabla 5); acilación del extremo N-terminal Gly, la sustitución del aminoácido de extremo C-terminal con el D-isómero correspondiente (indicado por una letra minúscula), y/o amidación del extremo C-terminal (Tabla 6). Las secuencias de péptidos ilustrativas seleccionadas con tales cambios se muestran en las Tablas 5 y 6.

5

Tabla 5. Secuencias de péptidos con modificaciones del extremo N-terminal o modificación de los extremos N- y C-terminales

Secuencia	SEQ ID NO.
Ac-GCCSDPRCRYRCR	186
Ac-GCCSDPRCRX3RCR	187
Ac-GCCTDPRCX2X3QCR	188
Ac-GCCTDPRCX2X3QCRRR	189
Ac-GCCTDPRCX2X3QCY	190
Ac-GX4CTDPRX4X2X3QCR	191
Ac-GCCTDPRCRX3QCF	192
Ac-GCCTDPRCRX3QCY	193
Ac-GCCTDPRCRX3QCW	194
Ac-GCCSDPRCRYRCR-amida	195
Ac-GCCSDPRCRX3RCR-amida	196
Ac-GCCTDPRCX2X3QCR-amida	197
Ac-GCCTDPRCX2X3QCRRR-amida	198
Ac-GCCTDPRCX2X3QCY-amida	199
Ac-GX4CTDPRX4X2X3QCR-amida	200
Ac-GCCTDPRCRX3QCF-amida	201
Ac-GCCTDPRCRX3QCY-amida	202
Ac-GCCTDPRCRX3QCW-amida	203

10

Tabla 6. Secuencias de péptidos con la sustitución de L-aminoácido del extremo C-terminal con un D-aminoácido y modificación del extremo N-terminal o modificación de los extremos N- y C-terminales

Secuencia	SEQ ID NO.
-----------	------------

Ac-GCCSDPRCRYRCr	204
Ac-GCCSDPRCRX3RCr	205
Ac-GCCTDPRCX2X3QCr	206
Ac-GCCTDPRCX2X3QCRRr	207
Ac-GCCTDPRCX2X3QCy	208
Ac-GX4CTDPRX4X2X3QCr	209
Ac-GCCTDPRCRX3QCf	210
Ac-GCCTDPRCRX3QCy	211
Ac-GCCTDPRCRX3QCw	212
Ac-GCCSDPRCRYRCr-amida	213
Ac-GCCSDPRCRX3RCr-amida	214
Ac-GCCTDPRCX2X3QCr-amida	215
Ac-GCCTDPRCX2X3QCRRr-amida	216
Ac-GCCTDPRCX2X3QCr-amida	217
Ac-GX4CTDPRX4X2X3QCr-amida	218
Ac-GCCTDPRCRX3QCf-amida	219
Ac-GCCTDPRCRX3QCy-amida	220
Ac-GCCTDPRCRX3QCw-amida	221

[0042] Los análogos de RglA pueden modificarse mediante la adición de puentes tales como puentes de lactama o puentes de triazolo. Como un ejemplo, las Figuras 3-5 muestran estructuras de puente formadas por modificaciones del péptido de SEQ ID NO:25. FIGURAS 3A-3C muestran tres esquemas diferentes de conectividad de puentes en análogos de RglA. En los esquemas de conectividad de puentes tal como se aplica a SEQ ID NO:25, X determina los residuos de cisteína en los que cada uno se sustituye por un residuo de aminoácido de origen natural o no natural. Los puentes #1 y #2 se forman a partir de fracciones de unión tal como se muestra en la FIGURA 3D. Para un péptido dado, los puentes #1 y #2 pueden formarse a partir de la misma o diferentes fracciones de unión. Los análogos de RglA pueden tener ambos puentes #1 y #2 formados a partir de puentes de disulfuro.

5 [0043] Tal como se describe en el presente documento, los análogos de RglA pueden tener o uno o ambos puentes de disulfuro sustituidos por un puente de lactama. FIGURA 4 muestra los ejemplos de 4 configuraciones de dichas sustituciones de puente de lactama en los análogos de RglA CSP-4-NH2 (SEQ ID NO: 25). La X en las posiciones 2, 3, 8 y 12 indica un residuo de cisteína sustituido por un aminoácido de origen natural o por un aminoácido de origen no natural diferente. Los procedimientos estándares de síntesis de péptidos se utilizan para la cadena principal de péptidos; la amida de unión puede formarse de manera selectiva mediante el uso de grupos protectores ortogonales con la química empleada para la cadena principal de péptidos.

10 [0044] Los análogos de RglA de la invención tienen un puente disulfuro de cisteína y uno de triazol. Los residuos de cisteína se sustituyen con un aminoácido que es un precursor de puente, se sustituyen con un aminoácido que es un componente de precursor de puente y contiene un grupo alquino o un grupo azida en su lado de cadena, en donde el grupo alquino y el grupo azida se unen para formar un 1,2,3-triazolo a través de química de cicloadición 1,3-dipolar. El fuente de triazol se forma a partir de una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, por ejemplo, «química click». FIGURA 5 muestra los ejemplos de 4 configuraciones de dichas sustituciones de puente de triazol en análogos de RglA CSP-4-NH2 (SEQ ID NO:25). En los ejemplos proporcionados en el presente documento, cada X en el péptido representa un residuo de cisteína reemplazado por (S)-propargil glicina o (S)-azidonorvalina. La invención se refiere a un péptido de conotoxina o una variante del mismo, tal como se define en las reivindicaciones.

15 [0045] Las «variantes» de análogos de RglA que se dan a conocer en el presente documento incluyen péptidos que tienen una o más adiciones de aminoácidos, supresiones, posiciones de parada o sustituciones en comparación con un péptido de conotoxina análogo divulgado en el presente documento.

20 [0046] Una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución conservadora o una no conservadora. Las variantes de análogos de RglA dados a conocer en el presente documento pueden incluir aquellas que tienen una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Tal como se utiliza en el presente documento, una «sustitución conservadora» implica una sustitución que se encuentra en uno de los siguientes grupos de sustitución conservadora:

5 Grupo 1: alanina (Ala o A), glicina (Gly o G), serina (Ser o S), treonina (Thr o T); Grupo 2: ácido aspártico (Asp o D), ácido glutámico (Glu o E); Grupo 3: asparagina (Asn o N), glutamina (Gln o Q); Grupo 4: arginina (Arg o R), lisina (Lys o K), histidina (His o H); Grupo 5: isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), metionina (Met o M), valina (Val o V); y Grupo 6: fenilalanina (Phe o F), tirosina (Tyr o Y), triptófano (Trp o W).

10 [0047] Adicionalmente, se pueden agrupar los aminoácidos en grupos de sustitución conservadora según función, estructura química o composición similares (por ejemplo, ácido, básico, aromático, que contiene azufre). Por ejemplo, una agrupación alifática puede incluir, con fines de sustitución, Gly, Ala, Val, Leu y Ile. Otros grupos que contienen aminoácidos que se consideran sustituciones conservadoras del uno por el otro incluyen: que contienen azufre: Met y Cys; ácidos: Asp, Glu, Asn y Gln; residuos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; residuos polares, cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu y Gln; residuos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; residuos grandes alifáticos, no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y residuos grandes aromáticos: Phe, Tyr y Trp. Se puede encontrar información adicional en Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman y Company.

15 [0048] Las variantes de secuencias de péptido de conotoxina análogas divulgadas o a las que se hace referencia en el presente documento incluyen también secuencias con como mínimo un 90 % de identidad de secuencia, como mínimo un 95 % de identidad de secuencia, como mínimo un 96 % de identidad de secuencia, como mínimo un 97 % de identidad de secuencia, como mínimo un 98 % de identidad de secuencia, como mínimo un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia peptídica. En el presente documento se dan a conocer las variantes de análogos de RgIA que incluyen péptidos que comparten: 70 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 80 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 81 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 82 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 83 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 84 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 85 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 86 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 87 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 88 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; o 89 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319. En una realización las variantes incluyen secuencias con 90 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 91 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 92 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 93 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 94 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 95 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 96 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 97 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; 98 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319; o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO:1-319.

20 [0049] «% de identidad de secuencia» hace referencia a una correspondencia entre dos o más secuencias, tal como se determina mediante la comparación de las secuencias. En la técnica, «identidad» también significa el grado de parentesco entre las secuencias de péptidos tal como se determina mediante la coincidencia entre las cadenas de tales secuencias. «Identidad» (a menudo se menciona como «similitud») se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos, que incluyen aquellos descritos en: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1994); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I (Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (Von Heijne, G., ed.) Academic Press (1987); y Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.) Oxford University Press, NY (1992). Los procedimientos preferidos para la determinación de identidad de secuencia se estructuran para proporcionar la mejor coincidencia entre las secuencias sometidas a pruebas. Los procedimientos para determinar la identidad de secuencia y la similitud se codifican en programas informáticos disponibles para el público. Las alineaciones de secuencias y los cálculos de porcentaje de identidad se pueden llevar a cabo utilizando el programa Megalign del paquete de cálculo bioinformático LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin). La alineación múltiple de las secuencias se puede llevar a cabo utilizando el procedimiento Clustal de alineamiento (Higgins y Sharp CABIOS, 5, 151-153 (1989) con parámetros predeterminados (PENALIZACIÓN POR HUECO=10, PENALIZACIÓN POR LONGITUD DE HUECO=10). Los programas relevantes incluyen también los paquetes de GCG de programas (Wisconsin Package Versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin); BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin); y el programa de FASTA que incorpora el algoritmo de Smith-Waterman (Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Fecha de Reunión 1992, 111-20. Editor(es): Suhai, Sandor. Editorial: Plenum, Nueva York, N.Y. En el contexto de esta divulgación se entenderá que cuando el software de análisis de secuencia se utiliza para el análisis, los resultados del análisis se basan en los «valores preestablecidos» del programa de referencia. Tal como se utiliza en el presente documento «valores preestablecidos» significarán cualquier conjunto de valores o parámetros que se cargaron inicialmente cuando se instaló el software por primera vez.

25 [0050] Los «análogos sustituidos por D» incluyen análogos de RgIA divulgados en el presente documento que tienen uno o más L-aminoácidos sustituidos por D-aminoácidos. El D-aminoácido puede ser el mismo tipo de aminoácido que aquél que se encuentra en la secuencias análoga o puede ser un aminoácido diferente. Por consiguiente, los D-análogos son también variantes.

[0051] Las «modificaciones» incluyen análogos de RglA divulgados en el presente documento en donde uno o más aminoácidos han sido sustituidos por un componente de no aminoácido o donde el aminoácido se ha conjugado con un grupo funcional o un grupo funcional se ha asociado de otro modo con un grupo aminoácido. Los aminoácidos modificados pueden ser, por ejemplo, un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado (unión covalente y no covalente o amalgamación de polímeros de polietilenglicol (PEG)), un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido fosforilado, un aminoácido conjugado con una fracción lipídica tal como un ácido graso o un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánica. La presencia de aminoácidos modificados puede ser ventajosa para, por ejemplo, aumento de semivida de suero de polipéptido y/o semivida in vivo funcional, (b) reducción de antigenicidad de polipéptidos, (c) aumento de estabilidad de almacenaje de polipéptidos, (d) aumento de solubilidad de polipéptidos, (e) prolongación de tiempo de circulación y/o (f) aumento de biodisponibilidad, por ejemplo, aumento del área bajo la curva (AUC_{sc}). El(los) aminoácido(s) puede(n) modificarse, por ejemplo, de manera co-translacional o post-translacional durante la producción recombinante (por ejemplo, glicosilación enlazada con N en modelos N-X-S/T durante la expresión en células de mamíferos) o modificarse mediante métodos sintéticos. El aminoácido modificado puede encontrarse en la secuencia o en el extremo terminal de una secuencia. Las modificaciones pueden incluir derivados tal como se describe en otra parte del presente documento.

[0052] Los péptidos se depuran en los riñones o mediante fagocitos fácilmente y poco después de la administración. Además, los péptidos son propensos a degradación por enzimas proteolíticas. La unión de péptidos de conotoxina a cadenas de ácidos grasos (lipidación) de diferentes longitudes y estructuras puede aumentar la semivida de péptidos en circulación promoviendo la interacción con proteínas en la sangre, tales como albúmina, que actúan como portadores. Los restos lipidos adecuados incluyen lípidos completamente saturados, así como lípidos no saturados, tales como lípidos mono-, bis-, tris- y poli-insaturados. En algunas realizaciones un resto con núcleo lipídico puede conjugarse con más de un péptido de conotoxina. Por ejemplo, dos de los mismos péptidos de conotoxina pueden conjugarse con un resto lipídico único.

[0053] Un éster activado de un ácido graso, tal como un éster de N-hidroxisuccinimidilo u otro éster activado derivado de un ácido graso con un ácido carboxílico libre y un reactivo de acoplamiento al péptido disponible comercialmente, se mezcla con el péptido de conotoxina de interés que contiene una amina libre, tal como glicina en el extremo N-terminal en un disolvente, tal como dimetilformamida y una base de tipo diisopropiletilamina. La mezcla se agita en oscuridad durante 12-16 horas y el producto de péptido de conotoxina lipido se aísla mediante la cromatografía de fase inversa semi-preparativa.

[0054] Las modificaciones de análogos de RglA descritos en el presente documento incluyen también la fusión del péptido con el dominio Fc de IgG, combinando de este modo la actividad biológica de los péptidos de RglA con la estabilidad de anticuerpos monoclonales. Tal como se describe en el presente documento, estos pepticuerpos de RglA se generan mediante tecnología recombinante fusionando un análogo de RglA formulado con una parte de Fc portion de IgG humana. Estas proteínas de fusión de péptido-Fc tienen generalmente un peso molecular inferior a 60-70 kDa, o aproximadamente la mitad del peso de anticuerpos monoclonales. La incorporación de la parte de Fc de IgG en pepticuerpos puede alargar la semivida a través de la protección de FcRn. La dimerización de dos regiones de Fc aumenta el número de péptidos activos que interactúan con la diana hasta dos veces (Wu et al., 2014).

[0055] En determinadas realizaciones, el péptido se fusiona con otros dominios de IgG o con albumina.

[0056] La presencia de aminoácidos modificados puede ser ventajosa para, por ejemplo, (a) aumentar la semivida de suero de péptido y/o la semivida in vivo, (b) reducir la inmunogenicidad de péptido, (c) aumentar la estabilidad de conservación de péptido, (d) aumentar la solubilidad de péptido, (e) alargar el tiempo de circulación, (f) aumentar la biodisponibilidad, por ejemplo, aumentando el área bajo la curva (AUC_{sc}), y/o (g) aumentar la biodisponibilidad bucal u oral mediante el aumento de absorción a través de la mucosa. El(los) aminoácido(s) puede(n) modificarse, por ejemplo, de manera co-translacional o post-translacional durante la producción recombinante (por ejemplo, glicosilación enlazada con N en modelos N-X-S/T durante la expresión en células de mamíferos) o modificarse mediante métodos sintéticos. El aminoácido modificado puede encontrarse en la secuencia o en el extremo terminal de una secuencia. Las modificaciones pueden incluir derivados tal como se describe en otra parte del presente documento.

[0057] El extremo C-terminal puede ser un ácido carboxílico o un grupo amida. La presente divulgación también se refiere a los análogos de RglA modificados adicionalmente mediante (i) adiciones realizadas en el extremo C-terminal, tales como Tyr, yodo-Tyr, una etiqueta fluorescente y/o (ii) adiciones realizadas en el extremo N-terminal, tales como Tyr, yodo-Tyr, piroglutamato o una etiqueta fluorescente.

[0058] Adicionalmente, pueden añadirse los residuos o grupos de residuos conocidos por los expertos para mejorar la estabilidad al extremo C-terminal y/o N-terminal. También, pueden añadirse los residuos o grupos de residuos conocidos por los expertos para aumentar la biodisponibilidad oral al extremo C-terminal y/o N-terminal.

[0059] En determinadas realizaciones, la modificación del extremo N-terminal incluye la acilación que incluye N-formilo, N-acetilo, N-propilo y grupos de ácidos grasos de cadena larga. En determinadas realizaciones, la modificación

del extremo N-terminal incluye la adición de un grupo PYRO. En determinadas realizaciones, la modificación del extremo C-terminal y/o N-terminal incluye fatilación mediante la adición de ácidos grasos desde 4 hasta 24, desde 10 hasta 18, o desde 12 hasta 16 átomos de carbono de longitud.

5 [0060] En determinadas realizaciones, la modificación del péptido incluye el acoplamiento del péptido a marcas fluorescentes, que incluyen tintes fluorescentes.

10 [0061] En determinados aspectos, la modificación del péptido incluye la sustitución de uno o más de enlaces de disulfuro con uno o más de los siguientes: puentes de dicarba tales como alcano (a través de hidrogenación de alqueno), Z-alqueno, E-alqueno, tioéter, selenoéter, trisulfuro, tetrasulfuro, polietoxiéter, enlazadores alifáticos y/o una combinación de enlazador alifático con una o más fracciones de alqueno (Z- o E-isómeros) que se sintetizan a través de las reacciones de metátesis de cierre de anillo.

15 [0062] En determinadas realizaciones, la modificación del péptido incluye PEGilación. La PEGilación consiste en la adición de una o más moléculas de poli-(etilenglicol) (PEG) a un péptido o una proteína y a menudo potencia la administración de proteína o péptido (Davies et al., 1977). Los péptidos se limpian mediante fagocitos renales fácilmente y poco después de la administración. Además, los péptidos son propensos a degradación con enzimas proteolíticas en la sangre. El acoplamiento de conopeptidos a polietilenglicol (PEG) de diferentes longitudes y estructuras puede aumentar la semivida de péptidos en la circulación. La PEGilación aumenta el peso molecular del péptido y, por consiguiente, reduce la velocidad a la que se filtra en los riñones; la PEGilación puede proteger también frente a proteasas y macrófagos y otras células del sistema reticuloendotelial (RES) que la puede eliminar. Adicionalmente, la PEGilación puede reducir cualquier inmunogenicidad asociada a un péptido extraño.

25 [0063] Un ejemplo de como los péptidos de conotoxinas pueden conjugarse con PEG es una conjugación de un valerato de poli(etilenglicol)-succinimidilo de metoxi con el análogo de RglA de péptido de conotoxina CSP-4-NH₂ (SEQ ID NO:25). 5-10 mg de péptido de conotoxina y mPEG-butiraldehído reaccionan a una proporción molar de 1,5:1 con agitación en 0,25 ml de dimetilformamida anhidra en presencia de 0,0026 ml de N,N-diisopropiletilamina a temperatura ambiente durante 16 horas en la oscuridad. La terminación de la reacción y la concentración del péptido de conotoxina se miden mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna de Poroshell C18. En otro tipo de reacción de conjugación de PEG, un butiraldehído de poli(etilenglicol) de metoxi (es decir, PEG) se une a un péptido de conotoxina. 5-10 mg de péptido de conotoxina CSP-4-NH₂ y mPEG-butiraldehído reaccionan a una proporción molar de 1,5:1 con agitación en 0,2 ml de 100 % de metanol a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una solución acuosa de cianoborohidruro de sodio hasta una concentración final de 1 mg/ml, seguida de un mezclado durante 16 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. La integridad de la reacción y la concentración de péptido de conotoxina PEGilado se mide mediante cromatografía de fase inversa que utiliza una columna de Poroshell C18. Los péptidos de conotoxina conjugados con mPEG se purifican mediante la eliminación de exceso de péptido de conotoxina mediante centrifugación en una columna de desalación. Las muestras se centrifugan a 1000 x g durante 2 minutos en una columna de desalación de Zeba Spin equilibrada con metanol, (volumen 2 ml, corte de peso molecular 7.000, ThermoScientific). La terminación de la reacción y la concentración del péptido de conotoxina PEGilado en el material centrifugado se mide mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna de Poroshell C18.

45 [0064] La presente divulgación está dirigida adicionalmente a derivados de los análogos de RglA divulgados. Los derivados incluyen análogos de RglA que tienen permutaciones cíclicas en las que los permutantes cíclicos retienen el modelo de unión original de péptido de conotoxina original (Craik, et al. (2001)), por ejemplo, un péptido de conotoxina ciclada que tiene un esqueleto cíclico de amida de tal manera que el péptido de conotoxina no tiene ningún extremo N- o C-terminal libre en el que el péptido de conotoxina incluye las uniones de disulfuro originales (Patente de EE. UU. número 7.312.195). Por ejemplo, el péptido de conotoxina cíclica incluye un péptido de conotoxina lineal y un enlazador de péptido, en donde los extremos N- y C-terminal del péptido de conotoxina lineal se unen a través del enlazador de péptido para formar el esqueleto de péptido cíclico con amida. En algunas realizaciones, el enlazador de péptido incluye aminoácidos seleccionados entre Gly, Ala y combinaciones de los mismos.

55 [0065] Se puede aplicar diferentes procedimientos de ciclación a los análogos de RglA descritos en el presente documento. Los análogos de RglA descritos en el presente documento pueden ciclarse fácilmente utilizando puentes de alanina tal como se describe en, por ejemplo, Clark, et al., 2013 y Clark, et al., 2012. La ciclación de los análogos de RglA puede mejorar su biodisponibilidad oral y reducir la susceptibilidad a proteólisis sin afectar la afinidad de los análogos de RglA con sus dianas específicas. La ciclación tiene lugar entre los extremos N- y C-terminal y puentes de disulfuro entre C1-C3 y C2-C4, respectivamente, donde el enlazador de ciclación GAAGAG puede tener cualquier longitud entre 1 y 8 aminoácidos y puede componerse de cualquier secuencia de aminoácidos. Tal como se da a conocer en el presente documento, la ciclación se realiza utilizando enlazadores alternativos tales como enlazadores de no péptidos que incluyen éteres de polietoxi, enlazadores alifáticos y/o cualquier combinación de enlazador alifático con uno o más restos de alqueno (isómeros Z o E) en la cadena de hidrocarburos que se puede sintetizar a través de reacciones de metátesis de cierre de anillo.

Tabla 7. Secuencias cicladas de análogos de RglA

Secuencia	SEQ ID NO.
-----------	------------

GCCSDPRCRX3RCRGAAGAG	13
GCCTDPRCX2X3QCRRGAAGAG	14
GCCTDPRCX2X3QCRRGAAGAG	15
GCCTDPRCX2X3QCYGAAGAG	16
GX4CTDPRX4X2X3QCRRGAAGAG	17
GCCTDPRCRX3QCFGAAAGAG	18
GCCTDPRCRX3QCYGAAGAG	19
GCCTDPRCRX3QCWGAAAGAG	20
X3 = des-X3, Ser, o Thr	

[0066] Los ejemplos dados a conocer en el presente documento incluyen los análogos de RglA descritos en el presente documento, así como variantes, análogos sustituidos por D, modificaciones y derivados de los análogos de RglA descritos en el presente documento.

En algunos ejemplos, variantes, análogos sustituidos por D, modificaciones y derivados tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 adiciones, supresiones, posiciones de parada, sustituciones, reemplazos, conjugaciones, asociaciones o permutaciones de secuencia. Cada péptido de conotoxina dado a conocer en el presente documento puede incluir también adiciones, supresiones, posiciones de parada, sustituciones, reemplazos, conjugaciones, asociaciones o permutaciones en cualquier posición incluyendo las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 de una secuencia de péptido de conotoxina análogo dado a conocer en el presente documento.

[0067] En algunos ejemplos se puede incluir una posición Xaa en cualquier posición de un péptido de conotoxina análogo, en donde Xaa representa una adición, supresión, posición de parada, sustitución, reemplazo, conjugación, asociación o permutación. En ejemplos particulares, cada péptido de conotoxina análogo tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 posiciones de Xaa en una o más posiciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18.

[0068] Tal como se describe en el presente documento, un análogo puede tener más de un cambio (adición, supresión, posición de parada, sustitución, reemplazo, conjugación, asociación o permutación) y calificarse como uno o más de un variante, análogo sustituido por D, modificación y/o derivado. O sea, la inclusión de una clasificación de análogo, variante, análogo sustituido por D, modificación y/o derivado no es exclusiva para estar incluido en otras clasificaciones y a todos se hace referencia de manera común como «péptidos de conotoxina» en el presente documento.

[0069] Los péptidos de conotoxina pueden prepararse utilizando tecnología de ADN recombinante. Los péptidos de conotoxina pueden prepararse también utilizando síntesis de fase sólida de Merrifield, aunque se pueden utilizar también otros equivalentes de síntesis química conocidos en la técnica. La síntesis de fase sólida empieza en el extremo C-terminal del péptido de conotoxina acoplando un α-aminoácido protegido a una resina adecuada. Se puede preparar dicho material inicial acoplando un aminoácido protegido por α-amino mediante un enlazador de éster a una resina clorometilada o una resina hidroximetilada o mediante un enlace de amida a una resina de benzidrilamina (BHA) o una resina de para-metilbenzidrilamina (MBHA). La preparación de la resina de hidroximetilo se describe en Bodansky et al. (1966). Las resinas clorometiladas están disponibles comercialmente en Bio Rad Laboratories (Richmond, California). La preparación de tal resina se describe en Stewart e Young (1969). Los soportes de resinas de BHA y MBHA están disponibles comercialmente y se utilizan de manera general cuando el péptido de conotoxina deseado que se sintetiza tiene una amida no sustituida en el extremo C-terminal. Por consiguiente, los soportes de resina sólidos pueden ser de cualquiera de aquellos que se conocen en la técnica, tal como uno que tiene la fórmula de soporte de resina -O-CH₂, soporte de resina -NH BHA o soporte de resina -NH-MBHA. Cuando se necesita la amida no sustituida, puede ser ventajoso utilizar una resina de BHA o MBHA dado que la escisión proporciona directamente la amida. En caso de que sea necesaria la amida de N-metilo, se la puede generar a partir de una resina de BHA de N-metilo. Cuando sean necesarias otras amidas sustituidas, se pueden utilizar las instrucciones de la

Patente de EE. UU. número 4.569.967, o si se necesitan otros grupos adicionales diferentes al ácido libre en el extremo C-terminal, es posible sintetizar el péptido de conotoxina utilizando los procedimientos clásicos tal como se establece en el texto de Houben-Weyl (1974).

[0070] El aminoácido del extremo C-terminal, protegido por Boc o Fmoc y por un grupo protector de cadena lateral, si procede, puede acoplarse primero a una resina clorometilada de acuerdo con el procedimiento establecido en Horiki et al. (1978), utilizando KF en dimetilformamida (DMF) a aproximadamente 60°C durante 24 horas con agitación, cuando hay que sintetizar un péptido de conotoxina que posee un ácido libre en el extremo C-terminal. Después del acoplamiento del aminoácido protegido por BOC a la resina de soporte, se puede eliminar el grupo protector de α-amino, tal como utilizando ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metíleno o TFA solamente. La desprotección se puede llevar a cabo a una temperatura entre 0°C y temperatura ambiente. Pueden utilizarse otros reactivos de adhesión estándar, tales como HCl en dioxano, y condiciones de eliminación de grupos protectores de α-amino

específicos tal como se describe en Schroder & Lubke (1965).

[0071] Después de la eliminación del grupo protector de α -amino, pueden acoplarse progresivamente los aminoácidos protectores de α -amino y cadena lateral en el orden deseado para obtener un compuesto intermedio o como una alternativa para añadir a cada aminoácido por separado durante la síntesis, algunos de ellos pueden acoplarse a uno antes de la adición del reactor de la fase sólida. La selección de un reactivo de acoplamiento apropiado está dentro de la competencia de la técnica. Los reactivos de acoplamiento de ilustración incluyen N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC, DIC, HBTU, HATU, TBTU en presencia de HoBt o HoAt).

5 **[0072]** Los reactivos de activación utilizados en la síntesis de fase sólida de péptidos que incluyen péptidos de conotoxina se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de reactivos de activación adecuados incluyen carbodiimidas, tales como N,N'-diisopropilcarbodiimida y N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Otros reactivos de activación y su uso en el acoplamiento de péptidos se describen en Schroder & Lubke (1965) y Kapoor (1970).

10 **[0073]** Cada aminoácido protegido o secuencia de aminoácidos puede introducirse en el reactor de fase sólida con un exceso de dos veces o más, y se puede llevar a cabo el acoplamiento en un medio de DMF:CH₂Cl₂ (1:1) o en DMF o CH₂Cl₂ solamente. En los casos en los que tiene lugar el acoplamiento de intermedio, el procedimiento de acoplamiento puede repetirse antes de la eliminación del grupo protector de α -amino antes del acoplamiento del próximo aminoácido. El éxito de la reacción de acoplamiento durante cada etapa de la síntesis, si se lleva a cabo manualmente, se puede controlar mediante la reacción de ninhidrina, tal como se describe en Kaiser, et al. (1970). Las reacciones de acoplamiento pueden llevarse a cabo de manera automática, como en un sintetizador automático Beckman 990, utilizando un programa, tal como presentado en Rivier, et al. (1978).

15 **[0074]** Después de que se haya completado la secuencia de aminoácidos deseada, se puede eliminar el péptido intermedio del soporte de la resina mediante el tratamiento con un reactivo, tal como fluoruro de hidrógeno líquido o TFA (si se utiliza química de Fmoc), el que no solamente se adhiere al péptido a partir de la resina, pero también se adhiere a todos los grupos protectores de cadena lateral restantes y también al grupo protector de α -amino en el extremo N-terminal, si no se eliminó previamente para obtener el péptido en forma del ácido libre. Si Met está presente en la secuencia, primero se puede eliminar el grupo protector de Boc utilizando TFA/etanoloditio antes de adhesión del péptido a partir de la resina con HF para eliminar la S-alquilación potencial. Cuando se utiliza fluoruro de hidrógeno o TFA para la adhesión, pueden incluirse uno o más removedores tales como anisol, cresol, sulfuro de dimetilo en el recipiente de reacción.

25 **[0075]** Se puede llevar a cabo la ciclación del péptido de conotoxina lineal, en lugar de ciclación del péptido de conotoxina como una parte del péptido-resina, para crear enlaces entre residuos de Cys. Para lograr dicho enlace de ciclación de disulfuro, se puede escindir un péptido de conotoxina completamente protegido a partir de un soporte de resina hidroximetilada o una resina clorometilada mediante amonólisis, tal como se conoce bien en la técnica, para generar el intermedio de amida completamente protegido, que de este modo está adecuadamente ciclado y desprotegido. Alternativamente, la desprotección, así como la escisión del péptido de conotoxina a partir de las resinas o una resina de benzidrilamina (BHA) o una metilbenzidrilamina (MBHA), puede llevarse a cabo a 0°C con ácido fluorídrico (HF) o TFA, seguido de oxidación tal como se describe anteriormente.

35 **[0076]** Los péptidos de conotoxina también pueden sintetizarse utilizando un sintetizador automático. Por ejemplo, aminoácidos pueden acoplarse sucesivamente a una resina MBHA Rink (típicamente 100 mg de resina) empezando en el extremo C-terminal utilizando un Sintetizador de Péptidos Automático Chemtech 357 Avanzado. Los acoplamientos se llevan a cabo utilizando 1,3-diisopropilcarbodiimida en N-metilpirrolidinona (NMP) o mediante hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y dietilisopropiletilamina (DIEA). Se puede eliminar el grupo protector de Fmoc mediante un tratamiento con solución de piperidina del 20 % en dimetilformamida (DMF). Posteriormente las resinas se lavan con DMF (dos veces), seguido de metanol y NMP.

45 **[0077]** Los péptidos de conotoxina pueden formularse dentro de composiciones farmacéuticas. «Composiciones farmacéuticas» significan unidades coherentes discretas físicamente adecuadas para la administración médica. «Composición farmacéutica en una forma de unidad de administración» significa unidades coherentes discretas físicamente adecuadas para la administración médica, cada una contiene una cantidad terapéuticamente eficaz o un múltiplo (hasta cuatro veces) o submúltiplo (por debajo de cuadragésimo) de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de conotoxina con un portador farmacéuticamente eficaz. Si la composición farmacéutica contiene una dosis diaria, o, por ejemplo, una mitad, un tercio o un cuarto de una dosis diaria, dependerá de si la composición farmacéutica debe administrarse una o, por ejemplo, dos, tres veces o cuatro veces al día, respectivamente.

55 **[0078]** La cantidad y la concentración de un péptido de conotoxina en una composición farmacéutica, así como la cantidad de la composición farmacéutica pueden seleccionarse basándose en los factores de relevancia clínica, la solubilidad del péptido de conotoxina en la composición farmacéutica, la potencia y la actividad del péptido de conotoxina, y la vía de administración de la composición farmacéutica. Solamente se necesita que el péptido de conotoxina constituya una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, de tal modo que una dosificación eficaz adecuada será consistente con la forma de dosificación utilizada en dosis de unidad única o múltiple.

- [0079]** Las composiciones farmacéuticas contendrán de manera general desde 0,0001 hasta 99 % en peso, preferiblemente desde 0,001 hasta 50 % en peso o desde 0,01 hasta 10 % en peso del péptido de conotoxina en peso de la composición total. Además del péptido de conotoxina, las composiciones farmacéuticas pueden contener también otros fármacos o agentes. Los ejemplos de otros fármacos o agentes incluyen agentes analgésicos, citocinas y agentes terapéuticos en todas las áreas principales de medicina clínica. Cuando se utilizan con otros fármacos o agentes, los péptidos de conotoxina pueden administrarse en forma de cócteles de fármacos. Un cóctel es una mezcla de cualquiera de los péptidos de conotoxina con otro fármaco o agente. En esta realización, un vehículo de administración común (por ejemplo, pastilla, comprimido, implante, bomba, solución inyectable, etc.) contendría los dos, el péptido de conotoxina en combinación con otros fármacos o agentes. Los componentes individuales del cóctel pueden administrarse en cantidades terapéuticamente eficaces o su administración puede crear una cantidad terapéuticamente eficaz.
- [0080]** Las composiciones farmacéuticas incluyen portadores farmacéuticamente aceptables que incluyen aquellos que no producen reacciones nocivas, alérgicas u otras desfavorables de manera importante que superan el beneficio de administración, o para investigación, profiláctica y/o tratamientos terapéuticos. Los portadores y las formulaciones farmacéuticamente aceptables ilustrativos se dan a conocer en Remington, 2005. Es más, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse para que cumplan los estándares de esterilidad, pirogenicidad y/o seguridad general tal como se exige por la Oficina de Administración de Alimentos y Fármacos de EE. UU. De Estándares Biológicos y/u otras agencias reguladoras correspondientes.
- [0081]** Típicamente, un péptido de conotoxina se mezclará con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables seleccionados para la vía de administración elegida. Para los ejemplos de vías de administración consulten la Patente de EE. UU. número 5.844.077.
- [0082]** Los portadores farmacéuticamente aceptables que se utilizan a modo de ilustración de manera general incluyen cualquiera y todos agentes de carga, rellenos, disolventes, co-disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes, agentes isotónicos, agentes de liberación, agentes retardantes de absorción, sales, estabilizadores, agentes tamponadores, agentes quelantes, geles, aglutinantes, agentes desintegrantes, agentes humidificantes, emulsionantes, lubricantes, agentes colorantes, agentes saborizantes y agentes aromatizantes.
- [0083]** Los agentes tamponadores de ilustración incluyen tampones de citrato, tampones de succinato, tampones de tartrato, tampones de fumarato, tampones de gluconato, tampones de oxalato, tampones de lactato, tampones de acetato, tampones de fosfato, tampones de histidina y sales de trimetilamina.
- [0084]** Los conservantes de ilustración incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencil amonio, haluros de benzalconio, cloruro de hexametonio, alquilparabenos, metilparabeno, propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.
- [0085]** Los agentes isotónicos de ilustración incluyen alcoholes de azúcar polihídricos, alcoholes de azúcar trihídricos o alcoholes de azúcar superiores tales como glicerina, eritritol, arabinol, xilitol, sorbitol y manitol.
- [0086]** Los estabilizadores de ilustración incluyen azúcares orgánicos, polietilenglicol, agentes reductores que contienen azufre, aminoácidos, péptidos con peso molecular bajo, inmunoglobulinas, polímeros hidrofilicos y polisacáridos.
- [0087]** Los antioxidantes de ilustración incluyen ácido ascórbico, metionina, vitamina E, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, antioxidantes solubles de aceite, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, agentes quelantes metálicos, ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico y ácido fosfórico.
- [0088]** Lubricantes de ilustración incluyen lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio.
- [0089]** Sales farmacéuticamente aceptables de ilustración incluyen sales ácidas y/o básicas, formadas con ácidos inorgánicos u orgánicos y/o bases, preferiblemente sales básicas. Aunque se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables, en particular cuando se utilizan los péptidos de conotoxina como medicamentos, otras sales encuentran utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de estos péptidos de conotoxinas o cuando no se contemplan usos de tipo no medicamento. Las sales de estos péptidos de conotoxinas pueden prepararse mediante los procedimientos reconocidos en la técnica.
- [0090]** Las sales farmacéuticamente aceptables de ilustración incluyen sales de adición inorgánicas y orgánicas, tales como clorhidrato, sulfatos, nitratos, fosfatos, acetatos, trifluoroacetatos, propionatos, succinatos, benzoatos, citratos, tartratos, fumaratos, maleatos, metanosulfonatos, isotonatos, acetatos de teofilina y salicilatos. Pueden utilizarse también sales de amonio cuaternario de alquilo inferior.
- [0091]** Para la administración oral, los péptidos de conotoxina pueden formularse en preparaciones sólidas o líquidas

- tales como cápsulas, pastillas, comprimidos, tabletas, derretibles, polvos, suspensiones o emulsiones. En la preparación de las composiciones en forma de administración oral, se puede utilizar cualquiera de los portadores farmacéuticamente aceptables comunes, tales como, por ejemplo, portadores tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes granuladores, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares, y en el caso de 5 preparaciones sólidas orales (tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos); o agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes, agentes de suspensión y similares en el caso de 10 preparaciones líquidas orales (tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones). Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas pueden representar una forma de unidad de administración oral, en cuyo caso se utilizan obviamente los portadores farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden estar 15 recubiertos con azúcar o tener un recubrimiento entérico mediante técnicas estándares. Se puede encapsular el péptido de conotoxina para hacerlo estable para que pase a través del tracto gastrointestinal al mismo tiempo, en determinadas realizaciones, facilitando la circulación a través de la barrera de la sangre cerebral. Véanse, por ejemplo, WO 96/11698.
- 20 [0092] Para la administración parenteral, los péptidos de conotoxina pueden disolverse en un portador farmacéuticamente aceptable y administrarse tanto como una solución o como una suspensión. Los portadores farmacéuticamente aceptables de ilustración incluyen agua, solución salina, soluciones de dextrosa, soluciones de fructosa, etanol o aceites de animales, vegetales o de origen sintético. Los portadores pueden contener otros 25 ingredientes, por ejemplo, conservantes, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, tampones y similares.
- 25 [0093] Los péptidos de conotoxina pueden estar en forma de polvo para la reconstrucción en el portador farmacéuticamente aceptable apropiado en el momento de administración. En otra realización, la forma de unidad de toma del péptido de conotoxina puede ser una solución del péptido de conotoxina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en un diluyente adecuado en ampollas estériles, herméticamente selladas o jeringuillas estériles.
- 30 [0094] Los péptidos de conotoxina pueden formularse como preparaciones de depósito. Las preparaciones de depósito pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como unas sales moderadamente solubles.
- 35 [0095] Adicionalmente, los péptidos de conotoxina pueden formularse como sistemas de liberación sostenida utilizando matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen como mínimo un compuesto. Se han creado diferentes materiales de liberación sostenida y se conocen por los expertos en la técnica. Los sistemas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su origen químico, liberar péptidos de conotoxina después de la administración durante un periodo de unas cuantas semanas hasta un periodo superior a 100 días.
- 40 [0096] También se puede lograr la administración del péptido de conotoxina utilizando bombas (véanse, por ejemplo, Luer et al., (1993), Zimm, et al. (1984) y Ettinger, et al. (1978)); microencapsulación (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. número 4.352.883, 4.353.888 y 5.084.350); implantes de polímeros de liberación continua (véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. número 4.883.666); y macroencapsulación (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. números 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859 y 4.968.733 y solicitudes de patentes PCT publicadas WO92/19195, WO 95/05452).
- 45 [0097] Cuando los péptidos de conotoxinas se administran por la vía intratecal, los péptidos pueden disolverse también en el fluido cerebroespinal. También se puede utilizar los injertos de células desnudas o no encapsuladas en el SNC. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. números 5.082.670 y 5.618.531.
- 50 [0098] Los péptidos de conotoxina de la presente divulgación y las composiciones farmacéuticas de los mismos, son útiles en los procedimientos de tratamiento de condiciones asociadas al subtipo del receptor $\alpha 9\alpha 10$ del receptor de acetilcolina de tipo nicotínico (nAChR) en un sujeto. La actividad de determinadas α -conotoxinas, que incluyen RgIA y sus análogos, durante el bloqueo del subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR ha sido demostrada en el presente documento en los estudios que utilizan oocitos que expresan diferentes subtipos del nAChR (Ellison et al., 2006; Vincler et al., 2006; WO 2008/011006; US 2009/0203616; US 2012/0220539). La actividad de α -conotoxinas, que incluyen RgIA, como un antinociceptivo y un analgésico se ha demostrado en los estudios de lesión con constricción crónica (Vincler, et al., 2006; WO 2008/011006; US 2009/0203616). La actividad de α -conotoxinas, que incluyen RgIA, durante la inhibición 55 de la migración de células inmunes se ha demostrado en los estudios de lesión con constricción crónica (Vincler, et al., 2006; WO 2008/011006; US 2009/0203616).
- 60 [0099] Los procedimientos descritos en el presente documento que incluyen la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de conotoxina divulgado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el péptido de conotoxina divulgado bloquea el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del nAChR. Los péptidos de conotoxina que bloquean el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR son útiles en el tratamiento de dolor, para tratar la inflamación y/o las condiciones de inflamación y para tratar cánceres y/o dolores relacionados con el cáncer. En determinadas realizaciones, los péptidos de conotoxina se basan de manera eficaz sobre su habilidad para inhibir la migración de células inmunes. En otras realizaciones, los compuestos se basan de manera eficaz en su habilidad de ralentizar la desmielinización y/o aumentar el número de fibras nerviosas intactas.

- 5 **[0100]** Los péptidos de conotoxina o variantes de los mismos de la invención o composición farmacéutica de la invención se pueden utilizar en el tratamiento de sujetos (humanos, animales veterinarios (perros, gatos, reptiles, pájaros, etc.), ganado (caballos, bovinos, cabras, cerdos, pollos, etc.) y animales de investigación (monos, ratas, ratones, peces, etc.)). El tratamiento de animales incluye la derivación de cantidades terapéuticamente eficaces de los péptidos de conotoxinas. Las cantidades terapéuticamente eficaces incluyen aquellas que proporcionan cantidades eficaces, tratamientos profilácticos y/o tratamientos terapéuticos.
- 10 **[0101]** Una «cantidad eficaz» es la cantidad de un péptido de conotoxina necesaria para lograr un cambio fisiológico deseado en el sujeto. A menudo las cantidades eficaces se administran con fines de investigación. Las cantidades eficaces dadas a conocer en el presente documento dan como resultado un cambio fisiológico deseado en un ensayo de investigación dirigido al estudio de eficacia de un péptido de conotoxina en el tratamiento de dolor, condiciones inflamatorias, inflamación y/o cáncer.
- 15 **[0102]** Un «tratamiento profiláctico» incluye un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos o síntomas de dolor, una afección inflamatoria, inflamación y/o cáncer o a un sujeto que muestra solamente signos o síntomas de dolor tempranos, una afección inflamatoria, inflamación y/o cáncer de tal manera que el tratamiento se administra además con el fin de reducir, prevenir o disminuir el riesgo de desarrollar el dolor, afección inflamatoria, inflamación y/o cáncer. Por consiguiente, un tratamiento profiláctico funciona como un tratamiento de prevención contra dolor, una afección inflamatoria, inflamación y/o cáncer.
- 20 **[0103]** Un «tratamiento terapéutico» incluye un tratamiento administrado a un sujeto quien muestra síntomas o signos de dolor, una afección inflamatoria, inflamación y/o cáncer y se administra al sujeto con el fin de disminuir o eliminar aquellos signos o síntomas del dolor, afección inflamatoria, inflamación y/o cáncer. El tratamiento terapéutico puede reducir, controlar o eliminar la presencia o la actividad de dolor, una afección inflamatoria, inflamación y/o cáncer y/o reducir el control o eliminar efectos secundarios de dolor, una afección inflamatoria, inflamación y/o cáncer.
- 25 **[0104]** Los tipos de dolor ilustrativos que pueden tratarse incluyen dolor general, dolor crónico, dolor neuropático, dolor nociceptivo y dolor por inflamación. Adicionalmente, estos tipos de dolor pueden asociarse a y/o inducirse mediante las causas que incluyen: nervio periférico o daño de nociceptor, condiciones inflamatorias, trastornos metabólicos, infección vírica, cánceres, dolor inducido por agentes quimioterapéuticos, dolor inducido por un procedimiento quirúrgico y dolor inducido por quemadura u otra lesión de tejido física.
- 30 **[0105]** Las cantidades terapéuticamente eficaces en el tratamiento de dolor neuropático inducido por quimioterapia (CINP) pueden incluir aquellos que disminuyen hiperalgesia mecánica, alodinia mecánica (dolor debido a un estímulo que normalmente no causa dolor), hiperalgesia térmica (inducida por calor), alodinia térmica (inducida por frío), el número de células inmunes migratorias, niveles de mediadores inflamatorios y/o niveles de dolor subjetivos presentados por el sujeto.
- 35 **[0106]** Las cantidades terapéuticamente eficaces en el tratamiento de dolor neuropático inducido por quemaduras pueden incluir aquellos que disminuyen hiperalgesia mecánica, alodinia mecánica, hiperalgesia térmica (inducida por calor), alodinia térmica (inducida por frío), el número de células inmunes migratorias, niveles de mediadores inflamatorios y/o niveles de dolor subjetivos presentados por el sujeto.
- 40 **[0107]** Las cantidades terapéuticamente eficaces en el tratamiento de dolor neuropático posoperatorio pueden incluir aquellos que disminuyen hiperalgesia mecánica, alodinia mecánica, hiperalgesia térmica (inducida por calor), alodinia térmica (inducida por frío), el número de células inmunes migratorias, niveles de mediadores inflamatorios y/o niveles de dolor subjetivos presentados por el sujeto.
- 45 **[0108]** Las condiciones inflamatorias de ilustración que pueden tratarse incluyen inflamación, inflamación crónica, enfermedades reumáticas (que incluyen artritis, lupus, espondilitis anquilosante, fibromialgia, tendinitis, bursitis, esclerodermia y gota), sepsis, fibromialgia, enfermedad inflamatoria intestinal (que incluye colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), sarcoidosis, endometriosis, fibromas uterinos, enfermedades cutáneas inflamatorias (que incluyen psoriasis y cicatrización de heridas deficiente), condiciones inflamatorias de los pulmones (que incluyen asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica), enfermedades asociadas a inflamación del sistema nervioso (que incluyen esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer), enfermedad periodontal y enfermedad cardiovascular.
- 50 **[0109]** Las cantidades terapéuticamente eficaces en el tratamiento de condiciones inflamatorias pueden incluir aquellas que disminuyen los niveles de marcadores de inflamación en la expresión genética o nivel de proteínas y/o reducen el número de células inmunes migratorias. Adicionalmente, el dolor asociado a condiciones inflamatorias puede tratarse mediante cantidades terapéuticamente eficaces que dan como resultado la disminución de hiperalgesia mecánica, alodinia mecánica, hiperalgesia térmica (inducida por calor), alodinia térmica (inducida por frío) y/o niveles de dolor subjetivos presentados por el sujeto.
- 55 **[0110]** Los cánceres ilustrativos que se pueden tratar incluyen cánceres de pecho. a9-nAChR se sobreexpresa en

tejido tumoral de pecho humano (Lee et al., 2010a) e inhibición del receptor mediante ARNpi u otro mecanismo redujo las propiedades cancerígenas in vitro e in vivo de células de cáncer de pecho, que incluye la inhibición de proliferación de células cancerígenas (Chen et al., 2011). En determinados aspectos, se utilizan los análogos de RglA en cantidades terapéuticas para inhibir el crecimiento tumoral mediante la inhibición de α9-nAChR.

- 5 [0111] Las cantidades terapéuticamente eficaces en el tratamiento de cánceres, tales como cánceres de pecho, pueden incluir aquellas que disminuyen un número de células tumorales, disminuyen el número de metástasis, disminuyen el volumen de tumor, aumentan la esperanza de vida, inducen la apoptosis de células cancerígenas, inducen la muerte de células cancerígenas, inducen quimio- o radiosensibilidad en células cancerígenas, inhiben la angiogénesis cerca de células cancerígenas, inhiben células con proliferación de células cancerígenas, inhiben células de crecimiento tumoral, previenen la metástasis, alargan la vida de un sujeto, reducen dolor asociado a cáncer y/o reducen la recaída o reaparición del cáncer en un sujeto que sigue el tratamiento.
- 10 [0112] Para la administración, se puede calcular las cantidades terapéuticamente eficaces basándose en los resultados de ensayos in vitro y/o estudios con modelos de animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos de animales para alcanzar un intervalo de concentración circulante que incluye un IC₅₀ tal como se determina en cultivo celular frente a una diana particular. Tal información puede utilizarse para determinar de manera más precisa dosis terapéuticamente eficaces en sujetos de interés.
- 15 [0113] La cantidad actual administrada a un paciente particular como una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar por un médico, veterinario o investigador que toma en consideración los parámetros tales como factores físicos y fisiológicos que incluyen diana; peso corporal; gravedad de la condición; tipo de dolor, afección inflamatoria o cáncer; intervenciones terapéuticas anteriores o actuales; idiopatía del sujeto; y la vía de administración.
- 20 [0114] Se puede ajustar la dosis de manera apropiada para alcanzar niveles de péptido de conotoxina deseados, localmente o sistemáticamente. Típicamente los péptidos de conotoxina de la presente divulgación muestran su efecto a una concentración de dosis que oscila entre 0,001 mg/kg y 250 mg/kg, preferiblemente entre 0,01 mg/kg y 100 mg/kg del péptido de conotoxina, más preferiblemente entre 0,05 mg/kg y 75 mg/kg. Se puede administrar una dosis adecuada en múltiples sub-dosis por día. Típicamente, una dosis o una sub-dosis puede contener desde 0,1 mg hasta 500 mg de péptido de conotoxina por forma de unidad de toma. Una dosis más preferida puede contener desde 0,5 mg hasta 100 mg de péptido de conotoxina por forma de unidad de toma.
- 25 [0115] Las dosis adicionales que son cantidades terapéuticamente eficaces a menudo pueden oscilar entre 0,1 y 5 25 µg/kg o entre 0,5 y 1 µg/kg. En otros ejemplos, una dosis puede incluir 1 µg /kg, 5 µg /kg, 10 µg /kg, 15 µg /kg, 20 µg /kg, 25 µg /kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, 50 µg/kg, 55 µg/kg, 60 µg/kg, 65 µg/kg, 70 µg/kg, 75 µg/kg, 80 µg/kg, 85 µg/kg, 90 µg/kg, 95 µg/kg, 100 µg/kg, 150 µg/kg, 200 µg/kg, 250 µg/kg, 350 µg/kg, 400 µg/kg, 450 µg/kg, 500 µg/kg, 550 µg/kg, 600 µg/kg, 650 µg/kg, 700 µg/kg, 750 µg/kg, 800 µg/kg, 850 µg/kg, 900 µg/kg, 950 µg/kg, 1000 µg/kg, 0,1 hasta 5 mg/kg, o desde 0,5 hasta 1 mg/kg. En otros ejemplos, una dosis puede incluir 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg o más.
- 30 [0116] En realizaciones particulares, la dosis puede comenzar en niveles más bajos y aumentar hasta que se logren efectos deseados. En el caso que la respuesta en un sujeto sea insuficiente a tales dosis, se pueden utilizar incluso dosis más altas (o dosis eficaces más altas mediante una vía de administración diferente, más localizada) hasta el punto de que lo permita la tolerancia del sujeto. Se contemplan la dosificación continua durante, por ejemplo, 24 horas, o dosis múltiples por día para lograr niveles sistémicos adecuados del péptido de conotoxina.
- 35 [0117] Las cantidades terapéuticamente eficaces pueden lograrse mediante la administración de dosis únicas o múltiples durante el transcurso de un régimen de tratamiento (por ejemplo, cada día, cada dos días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada semana, cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada mes, cada 2 meses, cada 3 meses, cada 4 meses, cada 5 meses, cada 6 meses, cada 7 meses, cada 8 meses, cada 9 meses, cada 10 meses, cada 11 meses o cada año).
- 40 [0118] Está disponible una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado puede depender del péptido de conotoxina a administrar, la gravedad de dolor, afección inflamatoria o cáncer que se está tratando y la dosis requerida para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz. Se puede utilizar cualquier modo de administración que está clínicamente aceptable, que significa cualquier modo que proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de conotoxina sin causar efectos adversos clínicamente no aceptables que superan los beneficios de administración de acuerdo con el juicio médico razonable. Vías de administración ilustrativas incluyen la administración intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraparenteral, intranasal, intranodal, intralinfática, intraperitoneal, intralesional, intraprostática, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratecal, intratumoral, intramuscular, intravesicular, oral, subcutánea y/o sublingual y más particularmente mediante la inyección intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraparenteral, intranasal, intranodal, intralinfática, intraperitoneal, intralesional, intraprostática, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratecal, intratumoral, intramuscular, intravesicular, oral, subcutánea y/o sublingual.

[0119] En una realización, el péptido de conotoxina se administra directamente en el sistema nervioso central (SNC), preferiblemente en los ventrículos cerebrales, parénquima cerebral, el espacio intratecal u otra localización de SNC adecuada.

5 [0120] Alternativamente, las terapias de direccionamiento pueden utilizarse para administrar el péptido de conotoxina más específicamente a determinados tipos de célula, mediante el uso de sistemas de direccionamiento tales como anticuerpos o ligandos específicos celulares.

10 [0121] Los péptidos de conotoxina pueden administrarse también en un sistema de administración basado en células en el que una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de conotoxina se introduce en las células diseñadas para la implantación en el cuerpo del sujeto. En realizaciones particulares, se puede utilizar este método de administración en la región de la médula espinal. Los sistemas de administración adecuados se describen en Patente de EE. UU. número 5.550.050 y Solicitud de PCT publicada números WO 92/19195, WO 94/25503, WO 95/01203, WO 95/05452, WO 96/02286, WO 96/02646, WO 96/40871, WO 96/40959 y WO 97/12635.

20 [0122] Se pueden preparar las secuencias de ácido nucleico adecuadas de manera sintética para cada péptido de conotoxina basándose en las secuencias divulgadas y el código genético conocido. En algunos ejemplos, el polinucleótido incluye un plásmido, un ADNc o un ARNm que puede incluir, por ejemplo, una secuencia (por ejemplo, un gen) para la expresión de un péptido de conotoxina. Los plásmidos adecuados incluyen vectores de plásmido estándares y plásmidos de minicírculo que se pueden utilizar para transferir un gen a una célula. Los polinucleótidos (por ejemplo, plásmidos de minicírculo) pueden incluir adicionalmente cualquier información de secuencia adicional para facilitar la transferencia del material genético (por ejemplo, una secuencia que codifica un péptido de conotoxina) a una célula. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden incluir promotores, tales como promotores generales, promotores de tejido específico, promotores de células específicas y/o promotores específicos para el núcleo o el citoplasma. Generalmente los promotores y los plásmidos (por ejemplo, plásmidos de minicírculos) se conocen bien en la técnica y pueden prepararse utilizando técnicas convencionales. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, los polinucleótidos se pueden utilizar para transfectar células. A menos que se indique lo contrario, los términos transfectar, transfected o transfección pueden utilizarse para indicar la presencia de polinucleótidos exógenos o el polipéptido expresado a partir de ellos en una célula. Se conoce que un número de vectores es capaz de mediar la transferencia de genes a células, tal como se conoce en la técnica.

35 [0123] En pocas palabras, el término «gen» hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de conotoxina. La definición incluye diferentes polimorfismos de secuencia, mutaciones y/o variantes de secuencia en donde tales alteraciones no afectan la función del péptido de conotoxina codificado. El término «gen» puede incluir no solamente las secuencias de codificación, pero también regiones reguladoras, tales como regiones promotoras, potenciadoras y de terminación. «Gen» puede incluir adicionalmente todos los intrones y otras secuencias de ADN cortadas y empalmadas a partir de la transcripción de ARNm, conjuntamente con las variantes que derivan de sitios de corte y empalme alternativos. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido de conotoxina pueden ser ADN o ARN que dirige la expresión del péptido de conotoxina. Estas secuencias de ácido nucleico pueden ser una secuencia de cadena de ADN o una secuencia de ARN que se traduce en proteína. Las secuencias de ácido nucleico incluyen tanto las secuencias de ácido nucleico de longitud completa como las secuencias de longitud no completa derivadas de la proteína de longitud completa. Las secuencias pueden incluir también codones degenerativos de la secuencia o las secuencias originales que pueden introducirse para proporcionar la preferencia del codón en un tipo de célula específico. Las secuencias genéticas para codificar el péptido de conotoxina que se dan a conocer en el presente documento están disponibles en bases de datos y publicaciones disponibles públicamente.

40 [0124] Tal como se indica, los péptidos de conotoxina divulgados en el presente documento bloquean el subtipo $\alpha 9\beta 10$ del nAChR. Se puede medir el bloqueo mediante cualquier método eficaz. En un aspecto, el bloqueo se mide como el desplazamiento de RgIA marcado a partir del subtipo $\alpha 9\beta 10$ del nAChR mediante un péptido de conotoxina divulgado en el presente documento. En un aspecto, el bloqueo puede representar un desplazamiento del 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de RgIA marcado a partir del subtipo $\alpha 9\beta 10$ del nAChR mediante un péptido de conotoxina divulgado en el presente documento.

55 [0125] En un segundo aspecto, se puede medir el bloqueo realizando un ensayo biológico en sobre un péptido de conotoxina divulgado en el presente documento para determinar su actividad terapéutica en comparación con los resultados obtenidos a partir del ensayo biológico de RgIA. En un aspecto, el bloqueo puede ser 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % superior a la actividad terapéutica del péptido de conotoxina divulgado en el presente documento cuando se compara con RgIA tal como se midió en el ensayo biológico.

60 [0126] En otro aspecto, se puede medir la afinidad de unión de un péptido de conotoxina divulgado en el presente documento con el subtipo $\alpha 9\beta 10$ del nAChR y comparar con la afinidad de unión de RgIA con el subtipo $\alpha 9\beta 10$ del nAChR. En una realización, el bloqueo puede ser un 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % superior a la afinidad

de unión del péptido de conotoxina divulgado en el presente documento en relación con RglA.

[0127] En un ejemplo, se analiza el efecto de un péptido de conotoxina divulgado en el presente documento sobre la función del subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del nAChR mediante la medición del efecto en ensayos funcionales, tales como ensayos electrofisiológicos, ensayos con escaneo de calcio y similares. En una realización, el bloqueo incluye un 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de reducción en la función del subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del nAChR tal como se midió mediante un ensayo funcional cuando se comparó con RglA.

[0128] Los péptidos de conotoxina divulgados en el presente documento también son útiles en los procedimientos de identificación de fármacos candidatos para su utilización en el tratamiento de condiciones asociadas al subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del nAChR. Estos procedimientos incluyen el escaneo de un fármaco candidato para su habilidad de bloquear la actividad del subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del nAChR.

[0129] «Fármaco candidato» hace referencia a cualquier péptido (incluyendo anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) o compuesto (molécula pequeña u otra cosa) que puede bloquear o de otra forma interferir en la actividad de una diana (es decir, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$). Las pequeñas moléculas pueden pertenecer a cualquier clase química sospechosas de interactuar con un complejo de péptido y esperadas que sean farmacéuticamente aceptables. Los fármacos candidatos pueden encontrarse en la naturaleza, sintetizarse mediante enfoques de química combinatoria y/o crearse a través de diseño de fármacos racional.

[0130] Se puede medir el bloqueo tal como se describe en otra parte en el presente documento excepto que el fármaco candidato puede compararse con los péptidos de conotoxina en el presente documento más que o además de RglA. Los péptidos de conotoxina son útiles en los procedimientos de identificación de fármacos candidatos que imitan la actividad terapéutica del péptido de conotoxina. Tales procedimientos incluyen las etapas de: (a) realización de un ensayo biológico sobre un fármaco candidato para determinar su actividad terapéutica; y (b) comparación de los resultados obtenidos a partir del ensayo biológico del fármaco candidato con los resultados obtenidos a partir del ensayo biológico de unos péptidos de conotoxina divulgados en el presente documento.

[0131] Los fármacos candidatos pueden interferir también con la actividad del subtipo $\alpha 9\alpha 10$ a través de la interacción con polinucleótidos (por ejemplo, ADN y/o ARN), y/o enzimas. Se puede conocer tales fármacos candidatos o agentes de modificación de ADN potenciales, que incluyen agentes nocivos para ADN (por ejemplo, agentes intercalantes que interfieren con la estructura de ácidos nucleicos); agentes aglutinantes de ADN; proteínas de unión de desajustes; y/o agentes alquilantes.

[0132] Un objetivo de diseño de fármacos racional es identificar fármacos candidatos que son, por ejemplo, formas más activas o estables del péptido de conotoxina, o que, por ejemplo, potencian o interfieren con la función de un péptido in vivo. Diferentes enfoques para su utilización en el diseño de fármaco racional incluyen análisis de estructura tridimensional, escaneos con alanina, modelado molecular y uso de anticuerpos anti-id. Tales técnicas pueden incluir coordinadas atómicas establecidas que definen una estructura tridimensional de un complejo de proteína formado por el péptido de conotoxina y el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del nAChR, y fármacos candidatos diseñados o seleccionados capaces de interferir con la interacción entre un péptido de conotoxina y el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del nAChR basado en las coordinadas atómicas.

[0133] Una vez que se seleccione un fármaco candidato para el estudio o desarrollo adicional, se puede modelar su estructura de acuerdo con sus propiedades físicas, por ejemplo, estereoquímica, unión, tamaño y/o carga utilizando datos a partir de una serie de fuentes, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, datos de difracción de rayos X y RMN. Se puede utilizar el análisis informático, mapeo de similitud (el que modela la carga y/o el volumen de un fármaco candidato, más que el enlace entre los átomos) y otras técnicas en este proceso de modelado.

[0134] Cuando se selecciona un fármaco candidato, se puede valorar el acoplamiento de grupos químicos adicionales. Se puede seleccionar los grupos químicos de tal modo que el fármaco candidato sea fácil de sintetizar, es probable que sea farmacológicamente aceptable, y no degrada in vivo, mientras, en algunos aspectos, retenga o mejore la actividad biológica de un péptido de conotoxina dirigido. De manera alternativa, cuando el fármaco candidato está basado en péptido, se puede alcanzar estabilidad adicional mediante la ciclación del péptido, que aumenta su rigidez. Los fármacos candidatos con grupos químicos acoplados pueden cultivarse adicionalmente para procurar que garanticen que retengan propiedades diana. A continuación, se puede llevar a cabo la optimización o modificación adicional para llegar a uno o más fármacos candidatos finales para los ensayos in vivo o clínicos.

[0135] Despues de la selección y optimización de un fármaco candidato, se puede fabricar el fármaco candidato seleccionado y optimizado y/o utilizar en una composición farmacéutica para ser administrado a sujetos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Amidación del extremo C-terminal aumenta la estabilidad de análogos de RgIA.

[0136] Se realizó la sustitución del grupo hidroxilo en el grupo carboxilo del extremo C-terminal de péptidos por un grupo amida en dos análogos de RgIA para aumentar la estabilidad. CSP-2 (SEQ ID NO:3) era considerablemente más estable, tal como se demostró por el porcentaje más alto del péptido restante, en una matriz biológica, donde el extremo C-terminal se amidó (es decir, adición de NH₂ al extremo C-terminal) en comparación con el grupo carboxilo original (Figura 2A). Se realizó un descubrimiento similar con CSP-4 (SEQ ID NO:5) y se mostró en la Figura 2B.

[0137] Las secuencias de péptidos de ilustración seleccionadas con amidación del extremo C-terminal para aumentar la estabilidad se describen en la Tabla 8.

10

Tabla 8. Secuencias de péptidos con amidación del extremo C-terminal

Secuencia	SEQ ID NO.
GCCSDPRCRYRCR-amida	21
GCCSDPRCRX12RCR-amida	22
GCCTDPRCX11X12QCR-amida	23
GCCTDPRCX11X12QCRRR-amida	24
GX28X28TDPRX28X11X12QX28Y-amida	25
GX13CTDPRX13X11X12QCR-amida	26
GCCTDPRCRX12QCF-amida	27
GCCTDPRCRX12QCY-amida	28
GCCTDPRCRX12QCW-amida	29

X11 = Citrulina

X12 = 3-yodo-tirosina

X13 = Selenocisteína

X28 = Cys, cualquier aminoácido de origen natural o cualquier aminoácido de origen no natural

Ejemplo 2. Lipidación de péptidos de conotoxina.

[0138] Se conjugó valerato de succinimidilo lipidoado CSP-4-NH₂ (SEQ ID NO:25). 5-10 mg de péptido de conotoxina y valerato de succinimidilo lipidoado reaccionaron a una proporción de peso molecular de 1,5:1 con agitación en 0,25 ml de dimetilformamida anhidra en presencia de 0,0026 ml de N,N-diisopropiletilamina a temperatura ambiente durante 16 horas en la oscuridad. La terminación de la reacción y la concentración del péptido de conotoxina lipidoado se mide mediante chromatografía de fase inversa utilizando una columna de Poroshell C18. El péptido de conotoxina lipidoado en dimetilformamida se purifica mediante chromatografía de fase inversa sobre una columna Hypersep C18 con una alimentación por gravedad. La muestra se carga en una columna con 95 % de H₂O / 5 % de metanol / 0,1 % de ácido fórmico. La columna se carga en el mismo tampón. La muestra se eluye en cuatro partes de lecho por volumen de 95 % de metanol / 5 % de H₂O / 0,1 % de ácido fórmico. Las partes que muestran que contienen péptido de conotoxina lipidoado mediante chromatografía de fase inversa utilizando una columna Poroshell C18 se combinan, liofilizan y vuelven a suspenderse en metanol.

[0139] La Figura 6 muestra las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de fármacos con péptidos aumentados mediante lipidación. La Figura 6 un CSP-4-NH₂ aumentado en su concentración cuando se conjugó con un lípido de 12 o 16 carbonos. La estabilidad de CSP-4-NH₂ se muestra también en la Figura 2B. La lipidación de CSP-4-NH₂ mediante un éster activado de un ácido graso de 12 carbonos crea C12-CSP-4-NH₂ y la lipidación mediante un éster activado de un ácido graso de 16 carbonos crea C16-CSP-4-NH₂. C12-CSP-4-NH₂ se podría detectar hasta un periodo de 16 horas, mientras que C16-CSP-4-NH₂ se podría detectar hasta un periodo de 24 horas.

Ejemplo 3. Evaluación de CSP-4 lipidoado en un modelo de capsaicina.

[0140] Se utilizó el modelo de capsaicina de dolor neuropático para evaluar el potencial terapéutico de análogos de RgIA en el tratamiento de dolor neuropático. En este modelo, se inyectaron 30 µg de Capsaicina por la vía intraplantar en el pata trasera de rata para crear dolor inducido por capsaicina en las ratas. La hiperalgesia térmica tal como se midió mediante la prueba de Hargreaves (una medición de sensibilidad al dolor; Hargreaves, et al., 1988) se realizó a los 15, 30 y 45 minutos después de la inyección de capsaicina. La latencia de retirada de pata se midió antes de la inyección de capsaicina (Punto de referencia). C12-CSP-4-NH₂, C16-CSP-4-NH₂, o vehículo sin péptido se inyectó por la vía subcutánea 2-3 horas antes de la inyección de capsaicina. Tal como se puede observar en las Figuras 7A y 7B, la inyección de C12-CSP-4-NH₂ y C16-CSP-4-NH₂ lipidoados dio como resultado la reducción de hiperalgesia térmica inducida por capsaicina.

Ejemplo 4. Evaluación de CSP-4 lipido y PEGilado en un modelo de CINP.

[0141] Se indujo CINP en ratas a través de la inyección de oxaliplatino de sal de platino por la vía intravenosa (2,4 mg/kg) dos veces a la semana durante un periodo de 3 semanas. La hiperalgesia mecánica habitualmente se induce en el modelo de CINP en el día 14 en el cual comienza el régimen terapéutico. La hiperalgesia mecánica se evaluó utilizando la prueba de Randall-Selitto. La prueba de Randall-Selitto es una medición de sensibilidad al dolor. Tal como se observa en las Figuras 8 y 9, la lipidación y la PEGilación, respectivamente, dieron como resultado una reducción en hiperalgesia en este modelo de ratón de dolor neuropático. La lipidación de CSP-4-NH₂ (Figura 8) con un éster activado de ácido dodecanoico para crear C12-CSP-4-NH₂ generó un beneficio terapéutico que duró 29 horas. PEGilación de CSP-4-NH₂ (Figura 9) con PEG-SVA para crear PEG-SVA-CSP-4-NH₂ extendió este efecto terapéutico farmacológico durante un periodo de 3 días.

[0142] La práctica de la presente divulgación emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética, inmunología, biología celular, cultivo celular y biología transgénica, que se encuentran dentro de la habilidad de la técnica. Véanse, por ejemplo, Maniatis et al., Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1982); Sambrook et al., Molecular Cloning, 2^a Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989); Sambrook y Russell, Molecular Cloning, 3^a edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, actualizado a lo largo de 2005); Glover, DNA Cloning (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, Nueva York, 1992); Guthrie y Fink, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press, Nueva York, 1991); Harlow y Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1998); Jakoby y Pastan, 1979; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, Essential Immunology, 6^a edición, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), 4^a edición, (Universidad de Oregon Press, Eugene, Oregon, 2000).

[0143] Tal como se entenderá por un experto en la técnica, cada realización divulgada en el presente documento puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en su elemento, etapa, ingrediente o componente declarado particular. Por consiguiente, los términos «incluye» o «que incluye» deberían interpretarse para enumerar: «comprende, consiste en o consiste esencialmente en». Tal como se utiliza en el presente documento, el término de transición «comprender» o «comprende» significa incluye, pero no se limita a, y facilita la inclusión de elementos, etapas, ingredientes o componentes no especificados, incluso en cantidades mayores. La frase transicional «que consiste en» excluye cualquier elemento, etapa, ingrediente o componente no especificado. La frase transicional «que consiste esencialmente en» limita el ámbito de la realización con relación a los elementos, etapas, ingredientes o componentes específicos y a aquellos que no afectan materialmente la realización.

[0144] Cada parámetro numérico debería interpretarse como mínimo según el número de dígitos importantes presentados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales. Cuando se necesita precisión adicional, el término «aproximadamente» tiene el significado atribuido a él razonablemente por un experto en la técnica cuando se utiliza en conjunto con un valor o intervalo numérico declarado, es decir, significa un poco superior o un poco inferior al valor o intervalo declarado, hasta en un intervalo de $\pm 20\%$ del valor declarado; $\pm 19\%$ del valor declarado; $\pm 18\%$ del valor declarado; $\pm 17\%$ del valor declarado; $\pm 16\%$ del valor declarado; $\pm 15\%$ del valor declarado; $\pm 14\%$ del valor declarado; $\pm 13\%$ del valor declarado; $\pm 12\%$ del valor declarado; $\pm 11\%$ del valor declarado; $\pm 10\%$ del valor declarado; $\pm 9\%$ del valor declarado; $\pm 8\%$ del valor declarado; $\pm 7\%$ del valor declarado; $\pm 6\%$ del valor declarado; $\pm 5\%$ del valor declarado; $\pm 4\%$ del valor declarado; $\pm 3\%$ del valor declarado; $\pm 2\%$ del valor declarado; o $\pm 1\%$ del valor declarado.

[0145] Los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se presentan tan precisamente como sea posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene esencialmente determinados errores que derivan necesariamente de la desviación estándar que se encuentra en sus mediciones de pruebas específicas.

[0146] Los términos "un", "una", "el/la", y referentes similares que se utilizan en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben entenderse como los que abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o claramente sea contradicho por el contexto. La recitación de intervalos de valores en el presente documento simplemente pretende servir como un procedimiento resumido de hacer referencia de manera individual a cada valor separada que se encuentra en el intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora en la especificación, como si se enumerara de manera individual en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos

que se indique lo contrario en el presente documento o a menos que esté claramente en desacuerdo con el contexto. El uso de cualquier o todos los ejemplos, o lenguaje de ilustración (es decir, «tal como») proporcionados en el presente documento simplemente pretende aclarar mejor la invención y no poner una limitación al ámbito de la invención a menos que se afirme. Ningún lenguaje en la especificación debería entenderse como el que indica cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

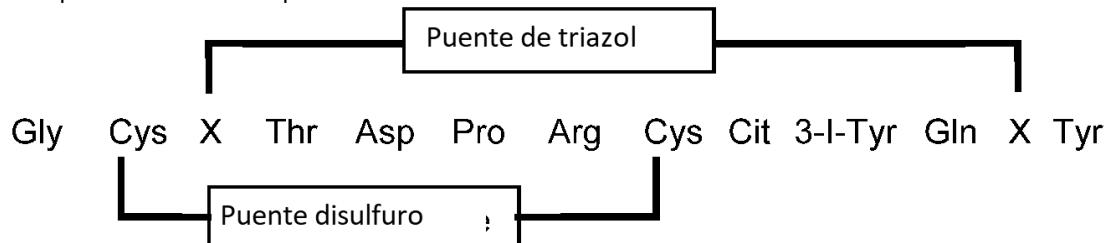
[0147] Las definiciones y las explicaciones utilizadas en la presente divulgación pretenden significar e intentan ser controladoras en cualquier construcción futura a menos que se modifiquen de manera clara y no ambigua en los ejemplos o cuando la aplicación del significado representa cualquier construcción sin sentido o absurda esencialmente.

En los casos cuando la construcción del término se interpretara como sin sentido o absurda esencialmente, la definición debería tomarse del Diccionario de Webster, 3^a edición o un diccionario conocido por los expertos en la técnica, tal como el Diccionario de Oxford de Bioquímica y Biología Molecular (Editorial Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

15

REIVINDICACIONES

1. Péptido de conotoxina que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se indica a continuación:



5

en el que cada X representa un residuo de cisteína reemplazado por (S)-propargil glicina o (S)-azidonorvalina; en el que el puente de triazol es



10

en el que el extremo C-terminal del péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida; o una variante del mismo con, como mínimo, un 90 % de identidad de secuencia, como mínimo, un 95 % de identidad de secuencia, como mínimo un 96 % de identidad de secuencia, como mínimo un 97 % de identidad de secuencia, como mínimo un 98 % de identidad de secuencia, o como mínimo un 99 % de identidad de secuencia;

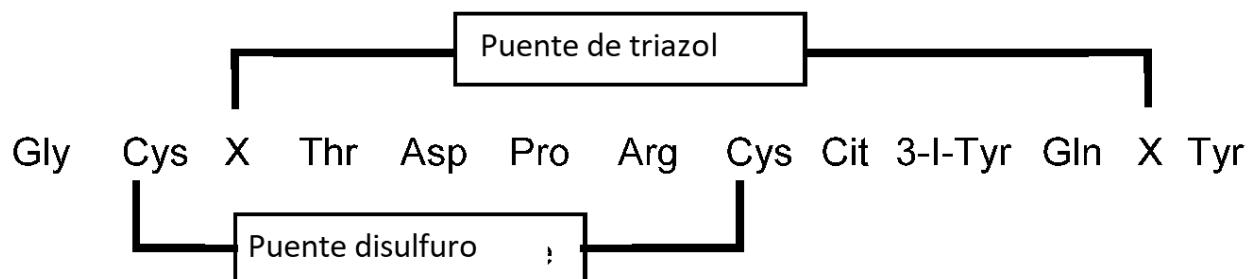
15

en el que la variante contiene una sustitución conservadora de aminoácidos; y
en el que la variante contiene dicho puente de triazol y dicho puente disulfuro.

20

2. Variante, según la reivindicación 1, en la que la sustitución conservadora de aminoácidos implica una sustitución que se encuentra en el grupo de sustitución conservadora que contiene aminoácidos que tienen residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr y Trp.

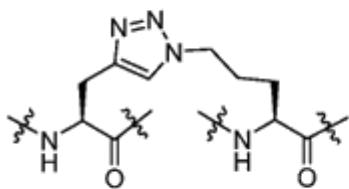
3. Péptido de conotoxina, según la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se indica a continuación:



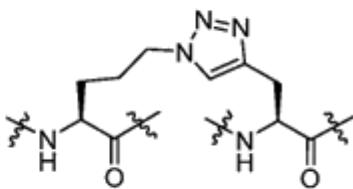
25

en el que cada X representa un residuo de cisteína reemplazado por (S)-propargil glicina o (S)-azidonorvalina; en el que el puente de triazol es

Triazol #3



Triazol #4



y en el que el extremo C-terminal del péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida.

- 5 4. Péptido de conotoxina o variante del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido de conotoxina o una variante del mismo se modifica mediante la adición de una o más moléculas de poli-(etilenglicol).
- 10 5. Composición farmacéutica que comprende el péptido de conotoxina o una variante del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 6. Péptido de conotoxina o variante del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 5, para su utilización en el tratamiento de dolor, una afección inflamatoria, dolor e inflamación, o inflamación y neuropatía.
- 20 7. Péptido de conotoxina o variante del mismo o una composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 6, en los que el dolor es dolor general, dolor crónico, dolor neuropático, dolor nociceptivo, dolor inflamatorio, dolor inducido por daño del nervio periférico, dolor inducido por un trastorno inflamatorio, dolor inducido por un trastorno metabólico, dolor inducido por cáncer, dolor inducido por quimioterapia, dolor inducido por un procedimiento quirúrgico y/o dolor inducido por una quemadura.
- 25 8. Péptido de conotoxina o variante del mismo o una composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 6, en los que la afección inflamatoria es inflamación, inflamación crónica, una enfermedad reumática, sepsis, fibromialgia, enfermedad inflamatoria intestinal, sarcoidosis, endometriosis, fibromas uterinos, una enfermedad inflamatoria cutánea, una afección inflamatoria de los pulmones, una enfermedad asociada a inflamación del sistema nervioso, enfermedad periodontal o enfermedad cardiovascular.

25

FIG. 1A

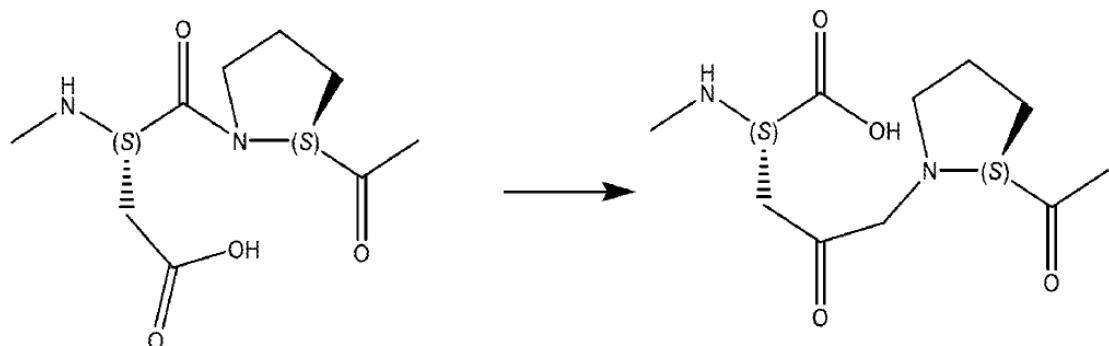


FIG. 1B

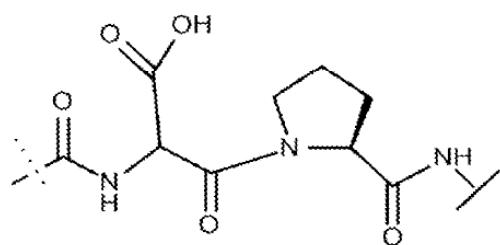


FIG. 1C

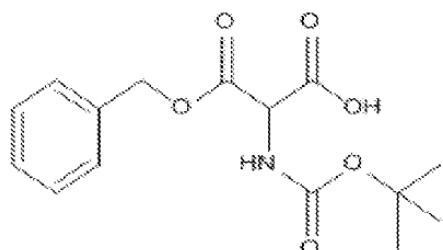


FIG. 1D

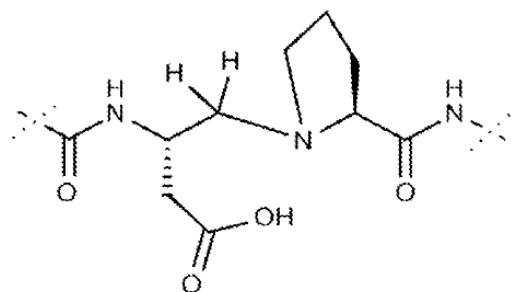


FIG. 1E

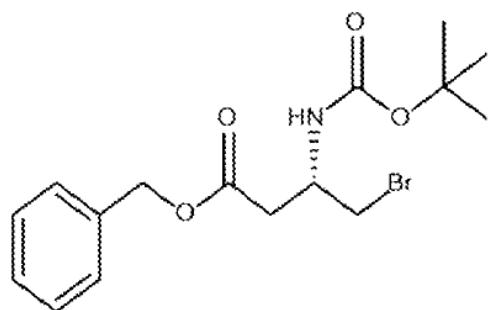


FIG. 1F

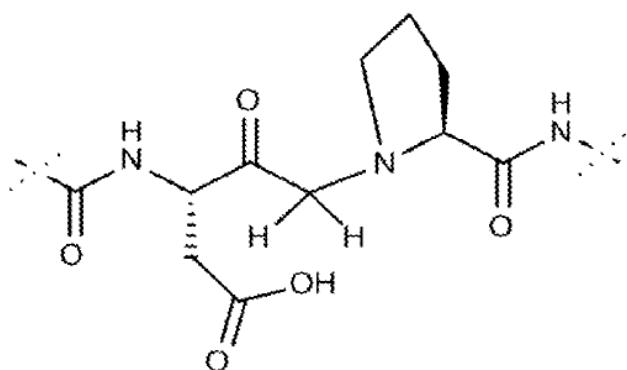


FIG. 1G

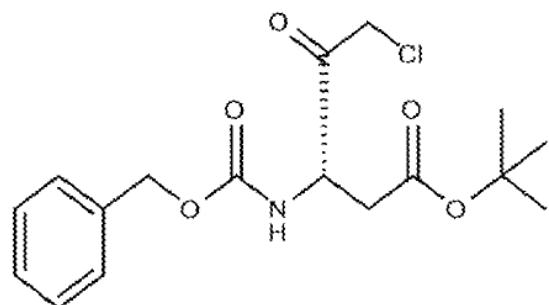


FIG. 2A

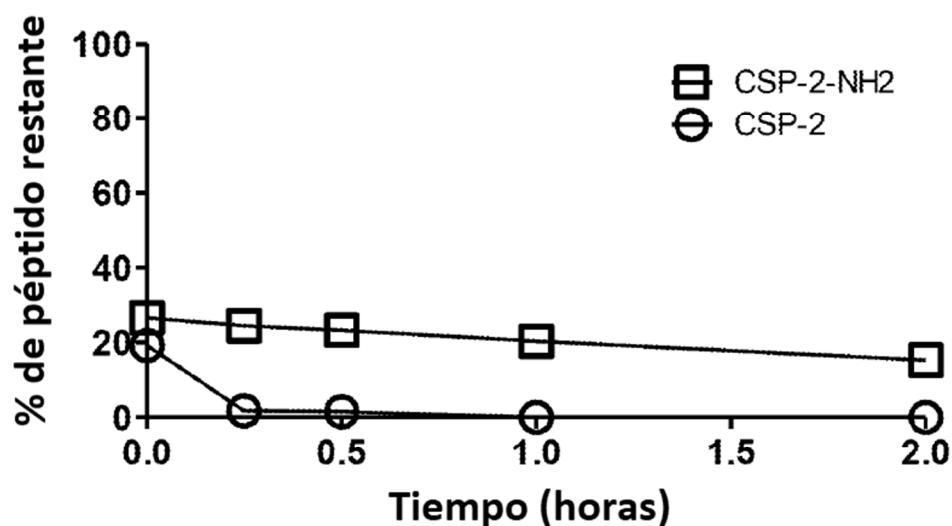


FIG. 2B

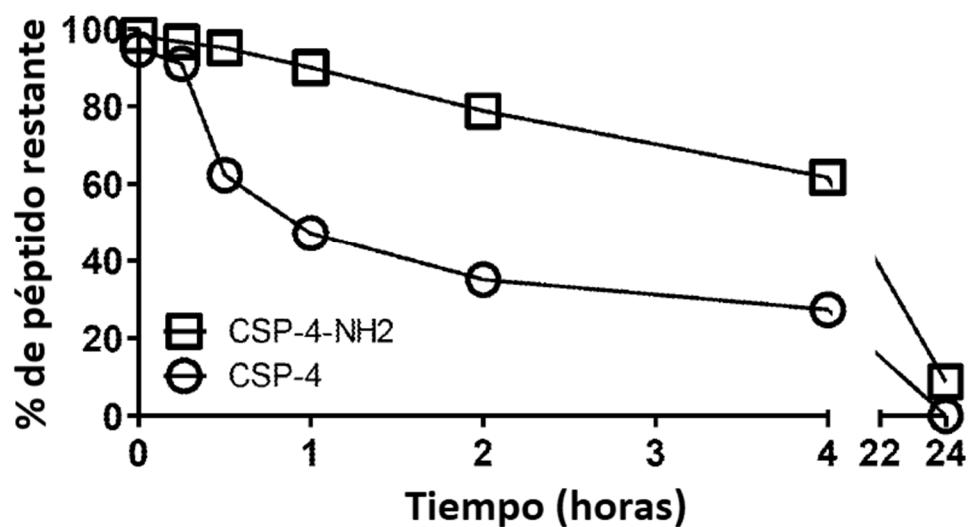


FIG. 3A

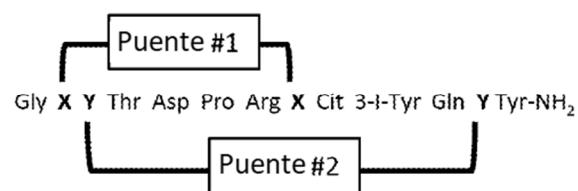


FIG. 3B

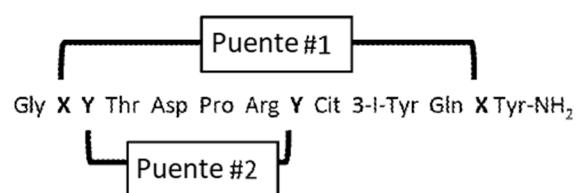


FIG. 3C

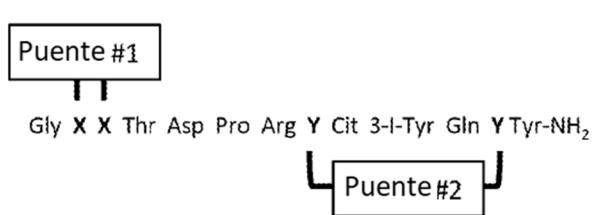


FIG. 3D

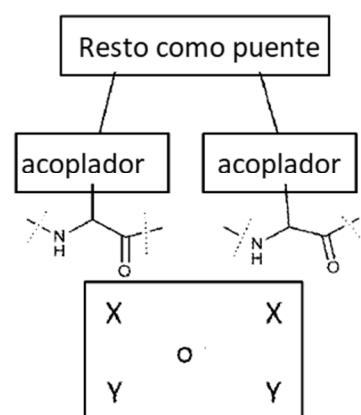


FIG. 4

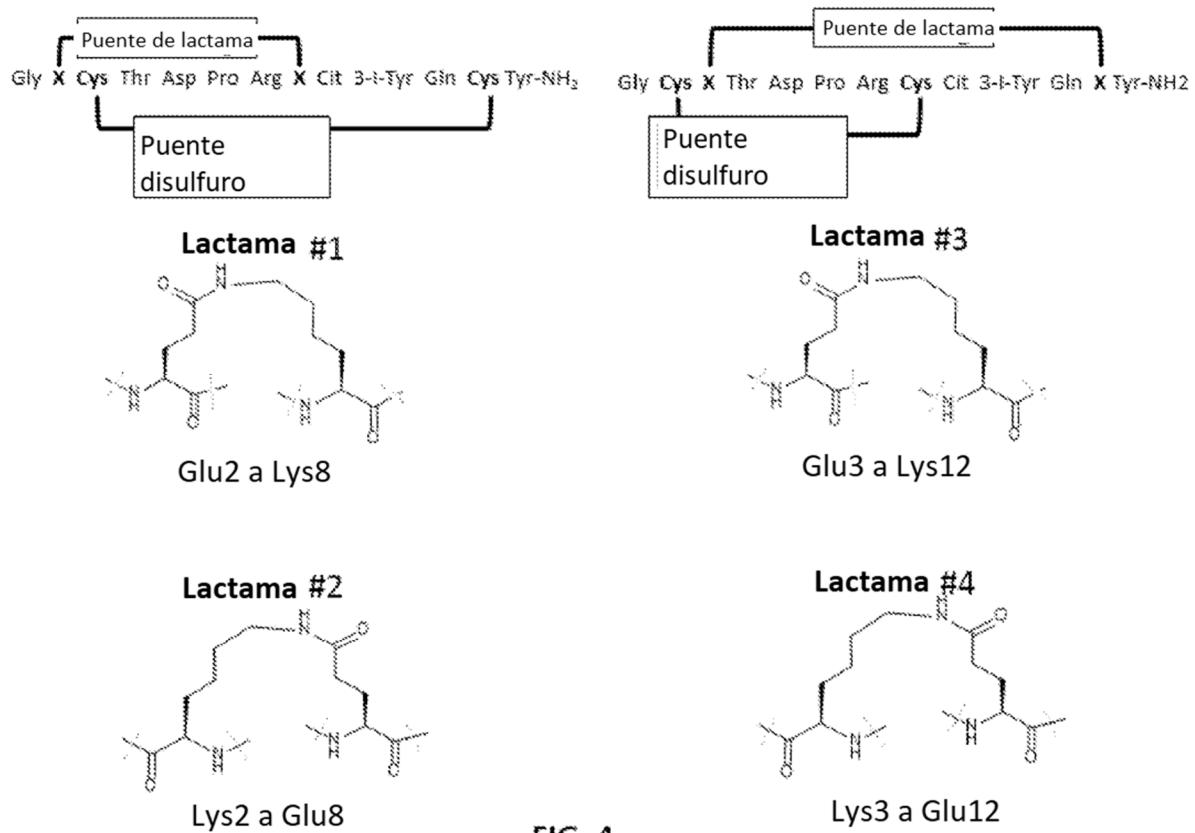


FIG. 4

FIG. 5

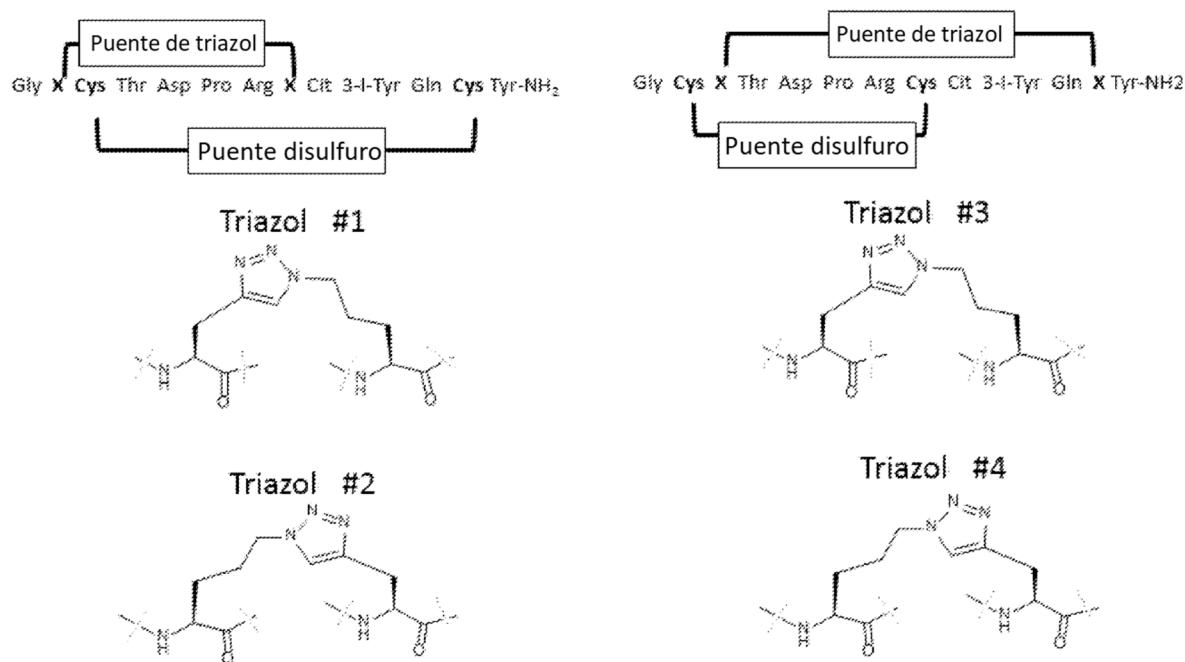


FIG. 6

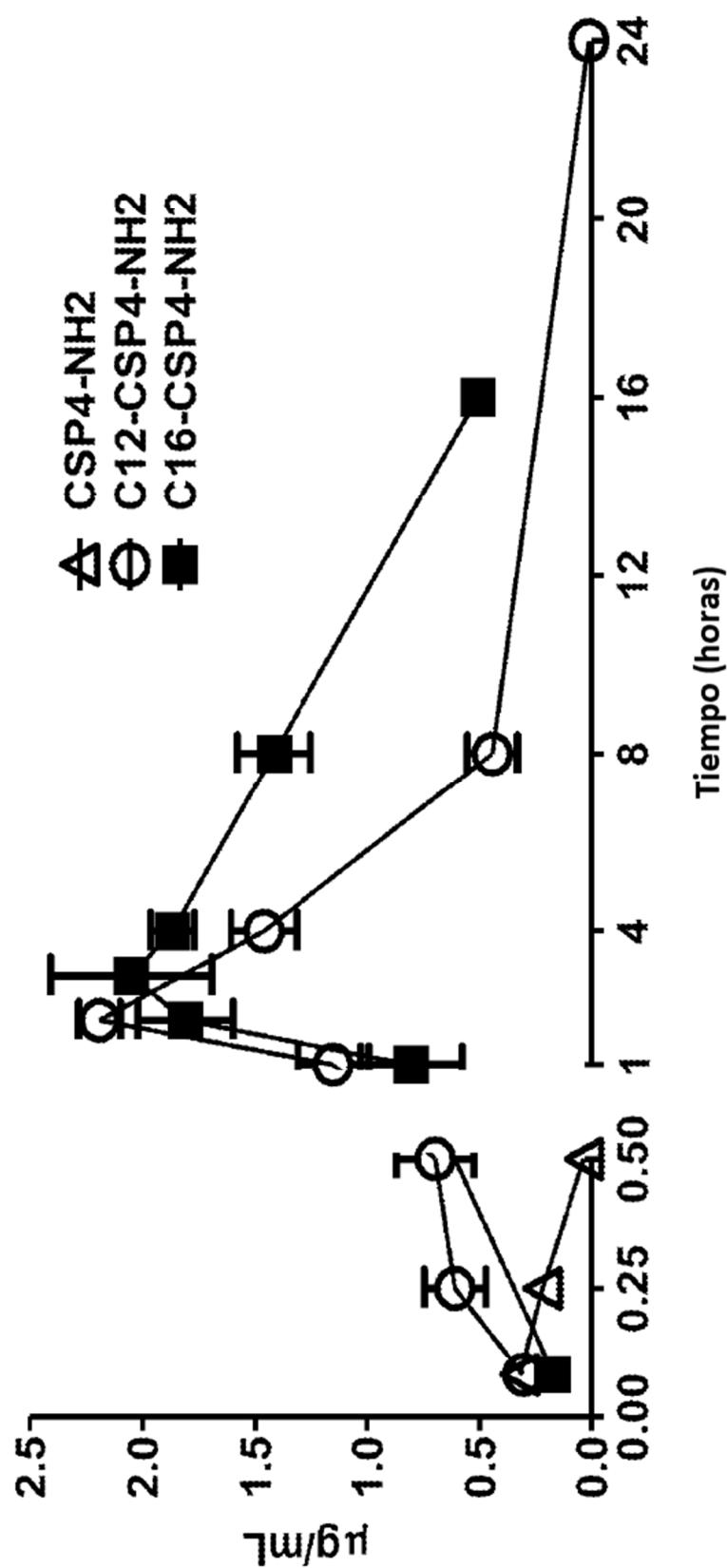


FIG. 7A

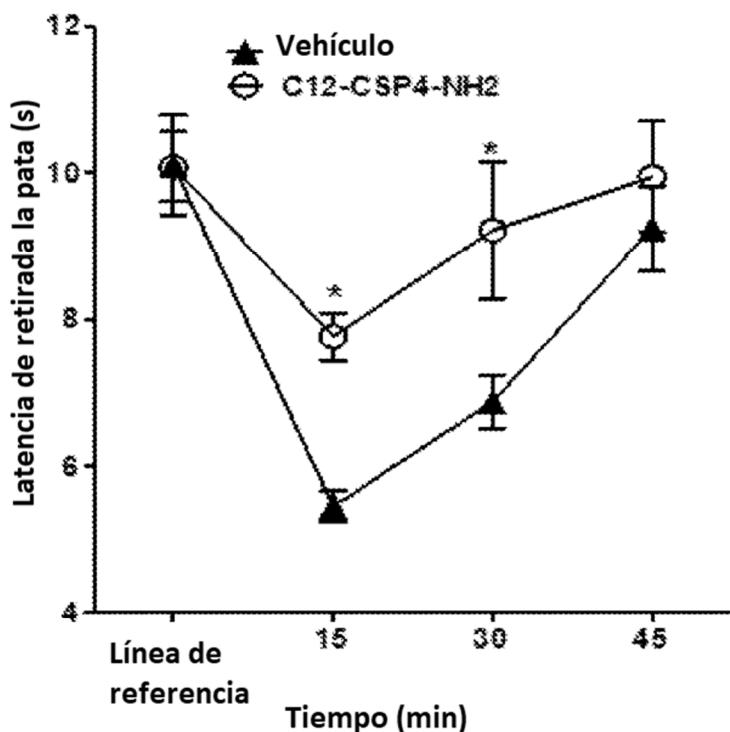


FIG. 7B

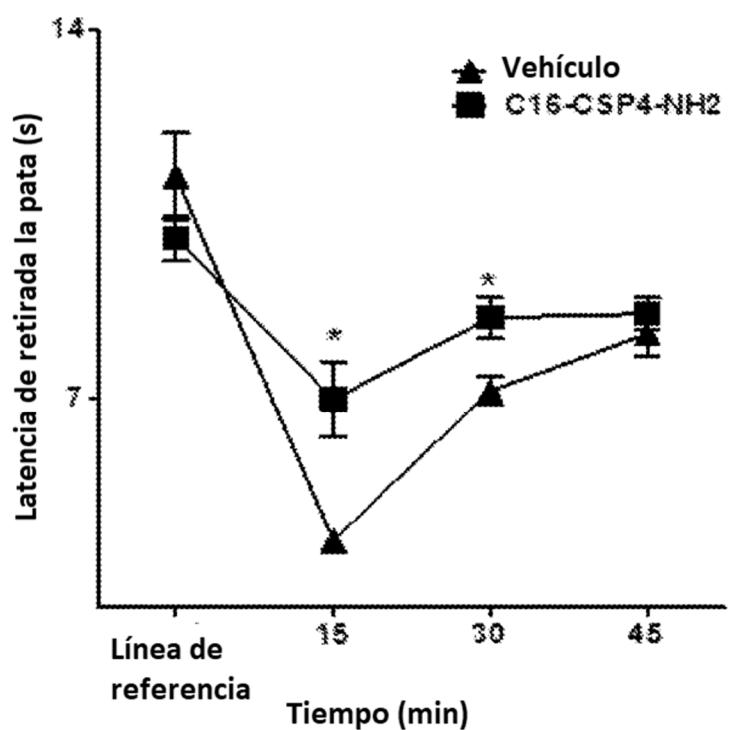


FIG. 8

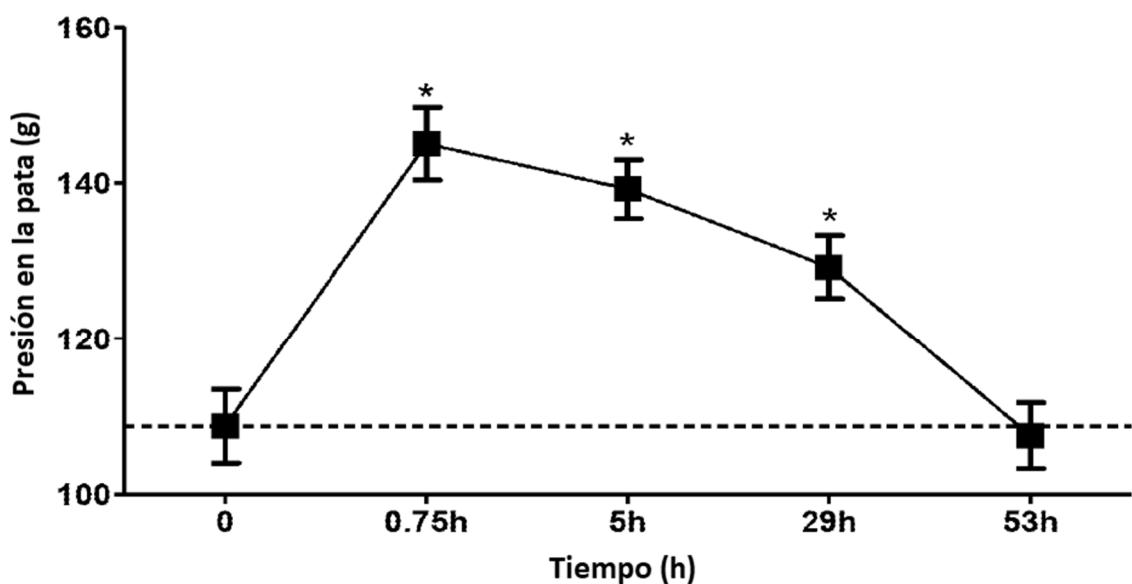


FIG. 9

