

Q.F.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No.

06-47666

54 TÍTULO

ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR B1 DE BRADIQUININA

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 47/48, C07C 47/18, A61P 29/00

71 SOLICITANTE

AMGEN INC.

DOMICILIO

THOUSAND OAKS, CALIFORNIA 91320-1799, U.S.A

74 APODERADO

EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

22 BOGOTÁ, D. C.,

Poder, Cristian, Amgen
F. N. 22-05 2006

(FORMA P-10)



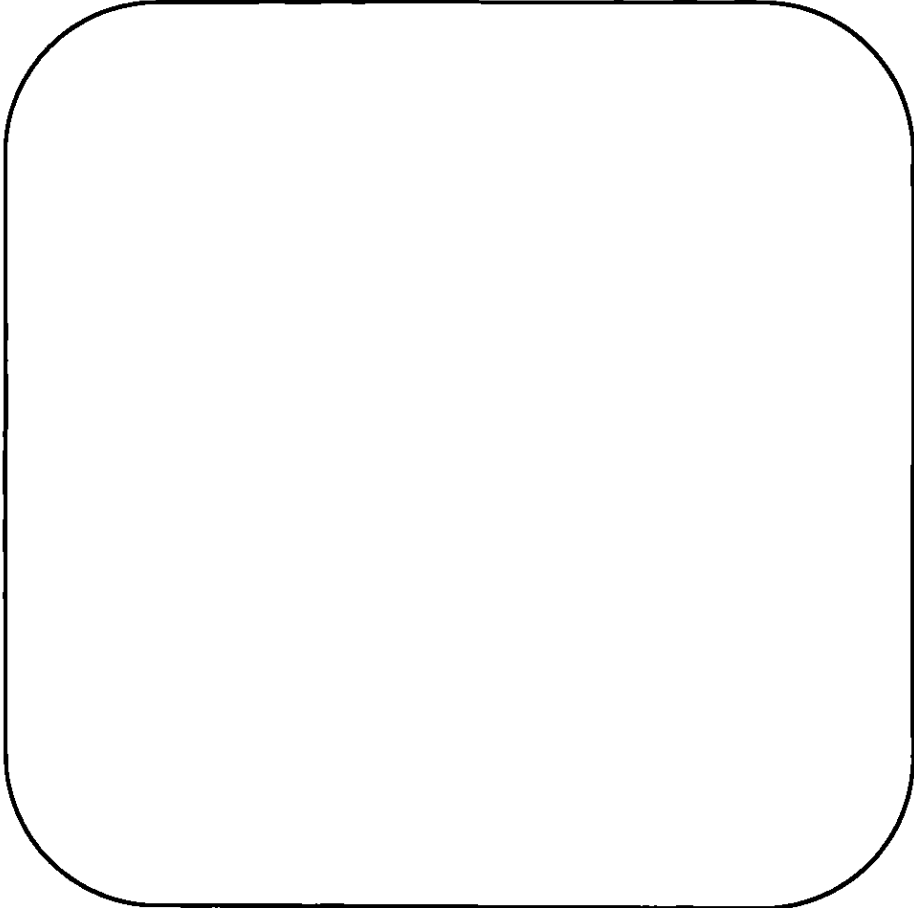
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-047888-00000-0000
FE 2008-05-18 17:48:44 Dep. 2020 NUECREACIONES cación
Tm 11 PATENTEN
Evr 370 FABRACIONALI
Ad 411 PRESENTACION Folios: 330

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1		SOLICITUD DE	
☒ Patente de Invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I		☒ Capítulo II	
2	Nombre AMGEN INC sociedad constituida y existente bajo las leyes del estado de California, Estados Unidos de América		IDENTIFICACIÓN
SOLICITANTE (71)	Dirección One Amgen Center Drive, Thousand Oaks California 91320-1799 Estados Unidos de América		CC ☐ NIT ☐ CE ☐ Otro ☐ Cual _____
Domicilio Thousand Oaks California 91320-1799 Estados Unidos de América		Numero _____	
3	Nombre EMILIO FERRERO		IDENTIFICACIÓN
REPRESENTANTE APODERADO	Dirección Carrera 4ª No 72-35		CC ☒ NIT ☐ CE ☐ Otro ☐ Cual _____
Teléfono 347 36 11		Numero 438 019 T P 31 929	
Fax 211 86 50			
E-mail clientes@camyp.com			
Domicilio Bogotá Colombia			
4	1 Gordon NG Blue Canyon 1733 Newbury Park, California 91320 Estados Unidos de América		
INVENTOR (ES) (72)	2 Yue-Sheng LI Shadow Hill Circle 3025 Thousand Oaks California 91360 Estados Unidos de América		
3 Colln V, GEGG 487 Delwood Court, Newbury Park, California 91320 Estados Unidos de América			
4. Benny, C ASKEW JR 515 Havendise Avenue, Newbury Park, California 91320 Estados Unidos de América			
5 Thomas STORZ 1724 Blue Canyon Street, Thousand Oaks, California 91320 Estados Unidos de América			
6 Yuelle LU 2479 Ridgebrook Place Thousand Oaks California 91360 Estados Unidos de América			
7 Derln, C D'AMICO, 4571 Calle Norte Newbury Park California 91320 Estados Unidos de América			
5	PCT (86)		
Solicitud Internacional No PCT/US2004/034976		Fecha 22 de octubre de 2004	
Publicación Internacional No WO 2005/042027 A2		Fecha 12 de mayo de 2005	
6	Título (54)		
ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR B1 DE BRADIQUININA			

7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 47/48, C07K 3/18, A61P 29/00</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	<u>US</u>	<u>22 de octubre de 2003</u>	<u>60/513,913</u>
	<u>US</u>	<u>24 de enero de 2004</u>	<u>60/538,929</u>
	<u>US</u>	<u>21 de octubre 2004</u>	<u>10/972,236</u>
9 Comprobante de pago No <u>06-36,137</u> Fecha <u>15 de mayo de 2006</u>			
10 Anexos			
☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463 000 oo			
☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad			
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica			
☐ Poderes, si fuere el caso			
☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante			
☐ Declaraciones			
☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)			
☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)			
☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA			
☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA			
☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso			
☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas			
☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico			
☐ Arte final 12x12			
☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud			
☒ Otros VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS			
11 FIGURA CARACTERÍSTICA			
			

12

Solicito la concesión de la patente,

N MBRE

EMILIO FERRERO

FIRMA



C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

- 1 ☒ **Publicación Internacional WO 2005/042027 A2**
Descripción
- 2 ☒ **Forma PCT/ISA/210 Informe de Búsqueda Internacional**
- 3 ☒ **Extracto de publicación**
- 4 ☒ **Listado de secuencias**

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 May 2005 (12.05 2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/042027 A2

(51) International Patent Classification⁷ A61K 47/48
C07K 7/18, A61P 29/00

Thousand Oaks, CA 91320 (US). LI, Yuelie [CN/US]
2479 Ridgebrook Place, Thousand Oaks, CA 91360
(US) D'AMICO, Derin, C. [US/US] 4571 Calle Norte,
Newbury Park CA 91320 (US).

(21) International Application Number
PCT/US2004/034976

(74) Agent SHARP, Robert, L. Amgen INC, One Amgen
Center Drive, M/S 27-4-A Thousand Oaks, CA 91320
(US)

(22) International Filing Date 22 October 2004 (22 10 2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data.
60/513 913 22 October 2003 (22 10 2003) US
60/538 929 24 January 2004 (24.01 2004) US
10/972,236 21 October 2004 (21 10 2004) US

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available) AE, AG, AL, AM
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US (patent) UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW

(63) Related by continuation (CON) or continuation in part
(CIP) to earlier application
US Not yet assigned (CIP)
Filed on 21 October 2004 (21 10.2004)

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available) ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors, and
(75) Inventors/Applicants (for US only) NG, Gordon
[CA/US], 1733 Blue Canyon Newbury Park, CA 91320
(US). LI, Yue-Sheng [US/US] 3025 Shadow Hill Cir-
cle Thousand Oaks, CA 91360 (US). GEGG, Collin,
V [US/US], 487 Delwood Court, Newbury Park, CA
91320 (US). ASKEW, JR., Benny, C. [US/US] 515
Havendise Avenue Newbury Park CA 91320 (US).
STORZ, Thomas [DE/US] 1724 Blue Canyon Street,

Published.
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two letter codes and other abbreviations refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette

(54) Title: ANTAGONISTS OF THE BRADYKININ B1 RECEPTOR

(57) Abstract. The present invention relates to certain biologically active peptides and conjugated peptides which can be used as
therapeutics or prophylactics against diseases or conditions linked to B1 as the causative agent. In a preferred embodiment of the
invention biologically active PBG-conjugated peptides are provided. In one aspect of the present invention pharmacologically active
PBG-conjugated peptides of the present invention are useful to treat inflammation or pain.

WO 2005/042027 A2

Antagonists of the Bradykinin B1 Receptor

This application claims the benefit of U S
Provisional Application No 60/513,913 filed October 22,
5 2003, and U S Provisional Application No 60/538,929
filed January 24, 2004, which are hereby incorporated by
reference

Background of the Invention

10

More than two million people in the United States
alone are incapacitated by chronic pain on any given day
(T M Jessell & D D Kelly, Pain and Analgesia in
PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE, third edition (E R Kandel,
15 J H Schwartz, T M Jessell, ed , (1991))
Unfortunately, current treatments for pain are only
partially effective, and many also cause life-style
altering, debilitating, and/or dangerous side effects
For example, non-steroidal anti-inflammatory drugs
20 ("NSAIDs") such as aspirin, ibuprofen, and indomethacin
are moderately effective against inflammatory pain but
they are also renally toxic, and high doses tend to cause
gastrointestinal irritation, ulceration, bleeding,
increased cardiovascular risk, and confusion Patients
25 treated with opioids frequently experience confusion and
constipation, and long-term opioid use is associated with
tolerance and dependence Local anesthetics such as
lidocaine and mixelitine simultaneously inhibit pain and
cause loss of normal sensation In addition, when used
30 systemically local anesthetics are associated with adverse
cardiovascular effects Thus, there is currently an unmet
need in the treatment of chronic pain

Pain is a perception based on signals received from the environment and transmitted and interpreted by the nervous system (for review, see Millan, M J , The induction of pain an integrative review Prog Neurobiol 57 1-164 (1999)) Noxious stimuli such as heat and touch cause specialized sensory receptors in the skin to send signals to the central nervous system ("CNS") This process is called nociception, and the peripheral sensory neurons that mediate it are nociceptors Depending on the strength of the signal from the nociceptor(s) and the abstraction and elaboration of that signal by the CNS, a person may or may not experience a noxious stimulus as painful When one's perception of pain is properly calibrated to the intensity of the stimulus, pain serves its intended protective function However, certain types of tissue damage cause a phenomenon, known as hyperalgesia or pronociception, in which relatively innocuous stimuli are perceived as intensely painful because the person's pain thresholds have been lowered Both inflammation and nerve damage can induce hyperalgesia Thus, persons afflicted with inflammatory conditions, such as sunburn, osteoarthritis, colitis, carditis, dermatitis, myositis, neuritis, inflammatory bowel disease, collagen vascular diseases (which include rheumatoid arthritis and lupus) and the like, often experience enhanced sensations of pain Similarly, trauma, surgery, amputation, abscess, causalgia, collagen vascular diseases, demyelinating diseases, trigeminal neuralgia, cancer, chronic alcoholism, stroke, thalamic pain syndrome, diabetes, herpes infections, acquired immune deficiency syndrome

8

("AIDS"), toxins and chemotherapy cause nerve injuries that result in excessive pain

As the mechanisms by which nociceptors transduce external signals under normal and hyperalgesic conditions become better understood, processes implicated in hyperalgesia can be targeted to inhibit the lowering of the pain threshold and thereby lessen the amount of pain experienced

Bradykinin (BK) and the related peptide, kallidin (Lys-BK) (see Table 3) mediate the physiological actions of kinins on the cardiovascular and renal systems. However, the active peptides, BK and kallidin, are quickly degraded by peptidases in the plasma and other biological fluids and by those released from a variety of cells, so that the half-life of BK in plasma is reported to be approximately 17 seconds (1). BK and kallidin are rapidly metabolized in the body by carboxypeptidase N, which removes the carboxyterminal arginine residue to generate des-Arg BK or des-Arg kallidin. Des-Arg-kallidin is among the predominant kinins in man and mediate the pathophysiological actions of kinins in man. In addition to being a very potent proinflammatory peptide, des-Arg-BK or des-Arg-kallidin is known to induce vasodilation, vascular permeability, and bronchoconstriction (for review, see Regoli and Barabe, Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins, Pharmacological Reviews, 32(1) 1-46 (1980)). In addition, des-Arg-BK and des-Arg-kallidin appear to be particularly important mediators of inflammation and inflammatory pain as well as being involved in the maintenance thereof. There is also a considerable body of evidence implicating the

overproduction of des-Arg-kallidin in conditions in which pain is a prominent feature such as septic shock, arthritis, angina, and migraine

The membrane receptors that mediate the pleiotropic actions of kinins are of two distinct classes, designated B1 and B2. Both classes of receptors have been cloned and sequenced from a variety of species, including man (Menke, et al, Expression cloning of a human b1 bradykinin receptor J Biol Chem 269 21583-21586 (1994), Hess et al, Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor Biochem Biophys Res Commun 184, 260-268 (1992)). They are typical G protein coupled receptors having seven putative membrane spanning regions. In various tissues, BK receptors are coupled to every known second messenger. B2 receptors, which have a higher affinity for BK, appear to be the most prevalent form of bradykinin receptor. Essentially all normal physiological responses and many pathophysiological responses to bradykinin are mediated by B2 receptors.

B1 receptors, on the other hand, have a higher affinity for des-Arg-BK (see Table 3) compared with BK, whereas des-Arg-BK is inactive at B2 receptors. In addition, B1 receptors are not normally expressed in most tissues. Their expression is induced upon injury or tissue damage as well as in certain kinds of chronic inflammation or systemic insult (Marceau, F, et al, Kinin B1 receptors a review Immunopharmacology, 30 1-26 (1995)). Furthermore, responses mediated by B1 receptors are up-regulated from a null level following administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS) or

inflammatory cytokines in rabbits, rats, and pigs (Marceau et al , (1998))

The pain-inducing properties of kinins coupled with the inducible expression of B1 receptors make the B1
 5 receptor an interesting target in the development of anti-inflammatory, antinociceptive, antihyperalgesic and analgesic agents that may be directed specifically at injured tissues with minimal actions in normal tissues While a variety of peptide antagonists targeting the B1
 10 receptor have been identified, their development as therapeutic analgesics has been stymied by poor efficacious half-lives resulting from very rapid degradation by tissue and serum peptidases and efficient renal clearance More recently, peptide analogs having
 15 non-natural amino acid substituents have been shown to be resistant to peptidases in in vitro stability assays (for review, see Regoli et al, Bradykinin receptors and their antagonists European Journal of Pharmacology, 348 1-10 (1998), Stewart, J M , et al, Bradykinin antagonists
 20 present progress and future prospects Immunopharmacology, 43 155-161 (1999), and Stewart, J M , et al , Metabolism-Resistant Bradykinin Antagonists Development and Applications Biol Chem , 382 37-41 (2001))

Covalent conjugation of proteins with poly(ethylene glycol) (PEG) has been widely recognized as an approach to
 25 significantly extend the in vivo circulating half-lives of therapeutic proteins PEGylation achieves this effect predominately by retarding renal clearance, since the PEG moiety adds considerable hydrodynamic radius to the
 30 protein (Zalipsky, S , et al , Use of functionalized poly(ethylene glycol)s for modification of polypeptides ,

in Poly(ethylene glycol) chemistry Biotechnical and
biomedical applications , J M Harris, Editor (1992),
Plenum Press New York p 347-370) Additional benefits
often conferred by PEGylation of proteins include
5 increased solubility, resistance to proteolytic
degradation, and reduced immunogenicity of the therapeutic
polypeptide The merits of protein PEGylation are
evidenced by the commercialization of several PEGylated
proteins including PEG-Adenosine deaminase (Adagen™/Enzon
10 Corp), PEG-L-asparaginase (Oncaspar™/Enzon Corp), PEG-
Interferon α -2b (PEG-Intron™/Schering/Enzon), PEG-
Interferon α -2a (PEGASYS™/Roche) and PEG-G-CSF
(Neulasta™/Amgen) as well as many others in clinical
trials PEGylation of small therapeutic peptides, on the
15 other hand, presents unique challenges and has not been
broadly applied One of the greatest obstacles to peptide
PEGylation is the essential requirement that biological
activity be preserved in the final conjugate Because
therapeutic peptides often comprise the minimal sequence
20 required for activity and are therefore very small, they
are relatively intolerant to substitution PEG moieties
are disproportionately larger than the peptide itself and
consequently are more likely to interfere sterically with
specific peptide receptor binding interactions required
25 for activity Thus, a peptide's ability to tolerate
PEGylation and still retain sufficient specific activity
to be a useful therapeutic is quite unpredictable and must
be empirically determined (Morpurogo, et al , Selective
Alkylation and Acylation of α and ϵ Amino Groups with PEG
30 in a Somatostatin Analogue Tailored Chemistry for

Optimized Bioconjugates Bioconjugate Chem 13 1238-1243
(2002))

Clearly, there is a need for new, safe and effective
treatments for inflammation and pain It would be an
5 advantage to have a B1 specific peptide antagonist that is
better able to tolerate systemic exposure during
treatment, by enhancing the circulating life (delayed
clearance), solubility, stability and/or decreasing the
immunogenicity of the molecule Increased circulating
10 life would result in a less frequent dosing regimen and a
less frequent dosing schedule would be more convenient to
both physicians and patients, and would be particularly
helpful to those patients involved in self-administration
Other advantages to less frequent dosing may include less
15 drug being introduced into patients and increased
compliance

Summary of the Invention

20 Accordingly, it is an object of the present invention
to provide novel binding agents of the B1 receptor with
demonstrably superior pharmacokinetic properties in vivo
as compared to known peptide B1 antagonists yet
sufficiently antagonize B1 receptor activity such that
25 they are therapeutically useful in the treatment or
prevention of inflammation, pain, and other B1 mediated
conditions including, but not limited to, asthma and
allergic rhinitis Such agents are provided by the
present invention in the form of novel peptide antagonists
30 and conjugated peptide antagonists of the B1 receptor
In one embodiment, the novel B1 receptor peptide

antagonists of the present invention comprise an amino acid sequence as shown in any one of SEQ ID NOS 15-54

According to some embodiments of this invention, one or more, and preferably between one to nine amino acid residues, independently selected from any of the twenty genetically coded L-amino acids or the stereoisomeric D-amino acids, will be coupled to either or both ends of the peptide sequences as shown in SEQ ID NOS 15-54

In another embodiment, the present invention also provides conjugated peptides which have demonstrably superior pharmacokinetic properties in vivo as compared to known peptide B1 antagonists yet they sufficiently bind to and antagonize the activity of the B1 receptor such that they may be used therapeutically

One aspect of the invention comprises a conjugated peptide of formula I



wherein

F is a vehicle covalently bound to X^1 or Y^1 (preferably F is a PEG moiety or a derivative thereof), X^1 and Y^1 are independently in each instance peptides of the formula $-L^1-P^1$ and $-L^2-P^2$, respectively, L^1 and L^2 are independently in each instance linkers, n is 0 to 3, and P^1 and P^2 are independently in each instance peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor. Preferably, P^1 and P^2 comprise an amino acid sequence as shown in any one of SEQ ID NOS 5-26, 43-60, and derivatives thereof

Another object of the present invention is to provide a pharmaceutical composition comprising excipient carrier

materials having a conjugated peptide of the invention dispersed therein

Another object of the present invention is to provide therapeutic methods of treatment which comprise
 5 administration to a mammal in need thereof a pharmaceutically effective amount of a composition comprising excipients and at least one peptide and/or conjugated peptide of the invention

The peptides and/or conjugated peptides of the
 10 invention have therapeutic value for the treatment of diseases mediated by B1 activation, including, but not limited to, inflammation and chronic pain states of inflammatory and neuropathic origin, septic shock, arthritis, osteoarthritis, angina, asthma, allergic
 15 rhinitis, and migraine

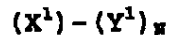
The peptides and/or conjugated peptides of the invention may be used for therapeutic or prophylactic purposes by formulating them with appropriate pharmaceutical carrier materials and administering an
 20 effective amount to a patient, such as a human (or other mammal) in need thereof

Additional useful peptides and/or conjugated peptides may result from conservative modifications of the amino acid sequences of the peptides and/or vehicle-conjugated
 25 peptides disclosed herein. Conservative modifications will produce peptides and/or conjugated peptides having functional, physical, and chemical characteristics similar to those of the peptides and/or conjugated peptide from which such modifications are made. Such conservatively
 30 modified forms of the peptides and/or conjugated peptides

disclosed herein are also contemplated as being an embodiment of the present invention

Another aspect of the invention relates to a method of making a conjugated peptide as described herein,
5 comprising the steps of

reacting a compound having the structure



wherein

X^1 and Y^1 are independently in each instance peptides
10 of the formula $-L^1-P^1$ and $-L^2-P^2$, respectively,

L^1 and L^2 are independently in each instance linkers,
 n is 0 to 3, and

P^1 and P^2 are independently in each instance peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor,

15 with a vehicle (F) to give a conjugated peptide of the formula $F-[(X^1)]$, $F-[(X^1)]-F$, $F-[(X^1)-(Y^1)_n]$, $F-(X^1)-(Y^1)_n$, or $F-(X^1)-(Y^1)_n-F$. Preferably F is a PEG moiety or a derivative thereof. More preferably, P^1 and P^2 are independently in each instance peptide antagonists of the
20 bradykinin B1 receptor comprising at least one of the peptide sequences shown in SEQ ID NOS 5-60. Even more preferably, X^1 is a peptide as shown in SEQ ID NOS 27-41. Additional aspects and advantages of the present invention will become apparent upon consideration of the detailed
25 description of the invention which follows

Detailed Description of the Invention

The present invention is based upon the surprising
30 finding that a class of peptides generally considered to be quite intolerant to substitution can be amino acid

substituted at the N-terminus and/or conjugated to various vehicles at the N-terminus to provide therapeutically useful peptides and/or peptide conjugates with dramatically sustained efficacy profiles as compared to the known peptides of the same class, and therefore they allow for their use to manage inflammation and pain. Thus, the peptides and/or peptide conjugates of the present invention provide tremendous therapeutic advantage over known B1 peptide antagonists. More particularly, the inventors have found that the previously described shortcomings in known B1 peptide antagonists with respect to their therapeutic use are surmountable by substituting amino acids at the N-terminus and/or conjugating the peptide antagonists to vehicles such as, but not limited to, polyethylene glycol (PEG) molecules using peptidyl or non-peptidyl linkers of defined size and composition which maximize preservation of antagonist activity and specificity while prolonging efficacious half-life *in vivo*. Additionally (or alternatively), it was discovered that despite the slightly reduced *in vitro* activity conferred to B1 peptide antagonists conjugated to larger PEG polymers, the extended circulating half-lives of the large PEG-conjugates provided significantly greater exposure and prolonged efficacy *in vivo* when compared to peptide conjugates conjugated to smaller PEG polymers. In addition, the present inventors have found that the size of the PEG molecule attached to a peptide antagonist of the B1 receptor is a critical parameter in optimizing the intrinsic antagonist activity and the efficacious half-life *in vivo*. For example, an acetylated peptide B1 antagonist demonstrated efficacy in relevant *in vivo*

models of pain for a maximum of 4 hours following multiple dosing. Surprisingly, the same peptide conjugated to a 5 kD and a 20 kD PEG molecule in the manner disclosed herein demonstrated efficacy for up to 2 days and for at least 4 days, respectively, after a single bolus injection.

Before the peptide and vehicle- or PEG-conjugated peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor of the present invention and methods for making and using such are described, it is to be understood that this invention is not limited to the particular peptides and/or conjugated peptide antagonists described, since peptides and/or conjugated peptide antagonists and methodologies contemplated by the present invention may, of course, vary slightly. It is to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims.

Bradykinin B1 receptor binding peptides contemplated for conjugation to a vehicle for purposes and in the manner as described herein include, but are not limited to, the novel B1 binding peptide antagonists disclosed herein as well as B1 binding peptide antagonists known in the art including, but not limited, to any peptide disclosed in any one of the following publications (each of which is hereby incorporated by reference in its entirety): Regoli et al, Bradykinin receptors and their antagonists Eur J of Pharma, 348 1-10 (1998), Neugebauer, W, et al, Kinin B₁ receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties Can J Physiol Pharmacol, 80 287-292 (2002), Stewart, J M, et al,

Bradykinin antagonists present progress and future prospects Immunopharmacology, 43 155-161 (1999), Stewart, J M , et al , Metabolism-Resistant Bradykinin Antagonists Development and Applications Biol Chem , 382 37-41 (2001), PCT Publication WO 98/07746, and U S Patent Nos 4,693,993, 4,801,613, 4,923,963, 5,648,336, 5,834,431, 5,849,863, 5,935,932, 5,648,333, 5,385,889, 5,444,048, and 5,541,286

The terms used throughout this specification are defined as follows, unless otherwise limited in specific instances

Natural amino acid residues are discussed in three ways full name of the amino acid, standard three-letter code, or standard single-letter code in accordance with the chart shown below

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

Unless clearly indicated otherwise, a designation herein of a natural or non-natural amino acid is intended to encompass both the D- and L- isomer of the amino acid Abbreviations used herein for unnatural amino acids are the same as described in U S Patent No 5,834,431 , PCT publication WO 98/07746, and Neugebauer, et al (2002), each of which is hereby incorporated by reference in its entirety Additionally, the abbreviation "Dab" and "D-Dab" is intended to refer to the L- and D- isomer of the

unnatural amino acid, D-2-aminobutyric acid, respectively
The abbreviation "3'PaI" and "D-3'PaI" is intended to
refer to the L- and D- isomer of the unnatural amino acid
3'-pyridylalanine, respectively Also, the abbreviation
5 "Igl" is intended to include both "IglA" and "Iglb" (α -(1-
indanyl)glycine and α -(2-indanyl)glycine, respectively)
Similarly, "DIgl" is intended to include both "D-IglA" and
"D-Iglb" (the D-isomers of α -(1-indanyl)glycine and α -(2-
indanyl)glycine, respectively) Preferably, when used
10 herein, Igl is Iglb and D-Igl is D-Iglb

By "vehicle-conjugated peptide" or "conjugated
peptide" is meant a compound which has biological activity
and which when administered to a mammal provides a
therapeutic effect The two parts include (1) at least
15 one B1 peptide antagonist and (2) at least one vehicle as
defined hereinbelow covalently bound to a residue of the
peptide itself or to a peptidyl or non-peptidyl linker
(including but not limited to aromatic linkers) that is
covalently bound to a residue of the peptide

20 By "PEG-conjugated peptide" or "PEGylated peptide" is
meant a two part compound which has biological activity
and which when administered to a mammal provides a
therapeutic effect The two parts include (1) at least
one B1 peptide antagonist and (2) at least one
25 polyethylene glycol (PEG) moiety covalently bound to a
residue of the peptide itself or to a peptidyl or non-
peptidyl linker (including but not limited to aromatic
linkers) that is covalently bound to a residue of the
peptide

30 By "polyethylene glycol" or "PEG" is meant a
polyalkylene glycol compound or a derivative thereof, with

or without coupling agents or derivatization with coupling or activating moieties (e g , with thiol, triflate, tresylate, azirdine, oxirane, orthopyridyl disulphide, vinylsulfone, iodoacetamide or a maleimide moiety)

5 PEG is a well-known, water soluble polymer that is commercially available or can be prepared by ring-opening polymerization of ethylene glycol according to methods well known in the art (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol 3, pages 138-
10 161) In the present application, the term "PEG" is used broadly to encompass any polyethylene glycol molecule, in mono- to poly functional form, without regard to size or to modification at an end of the PEG, and can be represented by the formula

15



where n is 20 to 2300 and X is H or a terminal modification, e g , a C₁₋₄ alkyl

20 Preferably, a PEG used in the invention terminates on one end with hydroxy or methoxy, i e , X is H or CH₃ ("methoxy PEG") It is noted that when X = CH₃ the other end of the PEG, which is shown in formula II terminating in OH, covalently attaches to an activating moiety via an
25 ether oxygen bond When X = H, both ends of the PEG are attached to activating moieties via ether bonds giving rise to linear bis-functionalized PEGs When used in a chemical structure, the term "PEG" includes the formula II above without the hydrogen of the hydroxyl group shown,
30 leaving the oxygen available to react with a free carbon atom of a linker to form an ether bond More

specifically, in order to conjugate PEG to a peptide, PEG must be in an "activated" form. Activated PEG can be represented by formula III

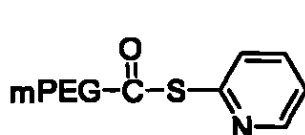
5 (PEG) - (A) III

where PEG (defined supra) covalently attaches to a carbon atom of the activation moiety (A) to form an ether bond, and (A) contains a reactive group which can react with an amino, imino, or thiol group on an amino acid residue of a peptide or a linker moiety covalently attached to the peptide

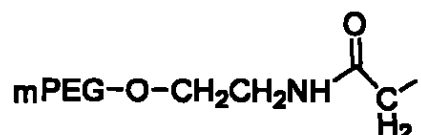
Methods for the preparation of activated PEGs are well known in the art, e.g., see U.S. Pat. Nos. 5,643,575, 15 5,919,455, 5,932,462, and PCT publication WO 95/06058 (each of which is hereby incorporated by reference in their entirety). Suitable activated PEGs can be produced by a number of conventional reactions. For example, an N-hydroxysuccinimide ester of a PEG (M-NHS-PEG) can be 20 prepared from PEG-monomethyl ether (which is commercially available from Union Carbide) by reaction with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and N-hydroxysuccinimide (NHS), according to the method of Buckmann and Merr, Makromol. Chem., 182 1379-1384 (1981). Other activated 25 PEGs, such as PEG-aldehydes, can be obtained from a commercial source, e.g., Nektar Therapeutics (Huntsville, Al) or Enzon, Inc. (Piscataway, N.J.). Examples of preferred activated PEG for purposes of the present invention are PEG-propionaldehyde and PEG-butyraldehyde 30 which are commercially available from Nektar Therapeutics (Huntsville, Al). PEG-propionaldehyde is represented by

the formula $\text{PEG-CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ and is described in U S Pat No 5,252,714, which is entirely incorporated by reference herein. In addition, bifunctional PEG aldehydes may be used to prepare dimeric conjugates

- 5 Additional preferred amine reactive PEGs include methoxy-PEG succinimidyl propionate (mPEG-SPA) and methoxy-PEG succinimido butanoate (mPEG-SBA), mPEG-benzotriazole carbonate or mPEG-p-nitrophenyl carbonate which are available in a variety of molecular weights
- 10 from Nektar Therapeutics (Huntsville, Al), Enzon, Inc (Piscataway, N J), or NOF Corporation (Tokyo, Japan). Additional preferred activated PEG moieties include thiol reactive functionalities including, but not limited to, PEG vinyl sulfones, represented by the formula PEG-
- 15 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{-CH=CH}_2$, mPEG-iodoacetate and mPEG-thioesters depicted below



mPEG-thioester



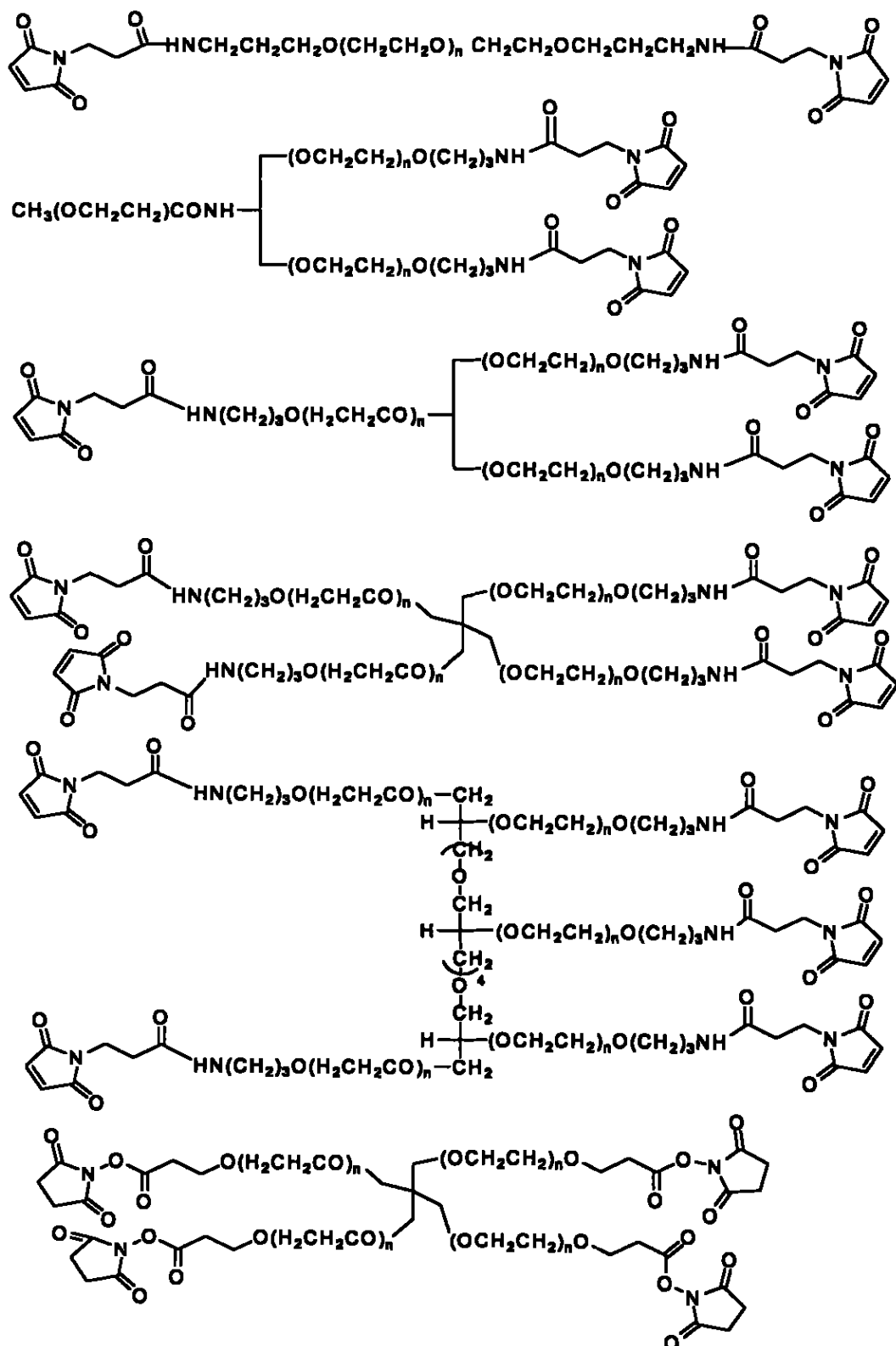
mPEG-iodoacetamide

- 20 Another preferred activated PEG for generating the PEG-conjugated peptides of the present invention is PEG-maleimide. Compounds such as maleimido monomethoxy PEGs are particularly useful for generating the PEG-conjugated peptides of the invention.
- 25 An even more preferred activated PEG for generating the PEG-conjugated peptides of the present invention is a multivalent PEG having more than one activated residues

- 18 -

Preferred multivalent PEG moieties include, but are not limited to, those shown below

- 19 -



Any molecular mass for a PEG can be used as practically desired e g , from about 1,000 Daltons (Da) to 100,000 Da (n is 20 to 2300) The number of repeating units "n" in the PEG is approximated for the molecular mass described in Daltons It is preferred that the combined molecular mass of PEG on an activated linker is suitable for pharmaceutical use Thus the combined molecular mass of the PEG molecules should not exceed 100,000 Da

Preferably, the combined or total molecular mass of PEG used in a PEG-conjugated peptide of the present invention is from about 3,000 Da to 60,000 Da (total n is from 70 to 1,400), more preferably from about 8,800 Da to 36,000 Da (total n is about 200 to about 820) The most preferred combined mass for PEG is from about 20,000 Da to 24,000 Da (total n is about 450 to about 540)

Other polyalkylene glycol compounds, such as polypropylene glycol, may be used in the present invention Other appropriate polyalkylene glycol compounds include, but are not limited to, charged or neutral polymers of the following types dextran, colominic acids or other carbohydrate based polymers, polymers of amino acids, and biotin derivatives

The term "comprising" means that a peptide or conjugated peptide may include additional molecular entities, including, but not limited to, amino acids, on either or both of the N- or C- termini of the given sequence Of course, these additional molecular entities should not significantly interfere with the activity of the peptide or conjugated peptide

As used herein, the term "native peptide" refers to an unconjugated B1 peptide antagonist disclosed herein or known in the art

The terms "derivatizing" and "derivative" or
5 "derivatized" comprise processes and resulting peptides or conjugated peptides, respectively, in which (1) the peptide or conjugated peptide has a cyclic portion, for example, cross-linking between cysteinyl residues within the conjugated peptide, (2) the peptide or conjugated
10 peptide is cross-linked or has a cross-linking site, for example, the peptide or conjugated peptide has a cysteinyl residue and thus forms cross-linked dimers in culture or in vivo, (3) the N-terminus of a conjugated peptide having a -NH₂ terminal group is replaced by -NRR¹, NRC(O)R¹, -
15 NRC(O)OR¹, -NRS(O)₂R¹, -NHC(O)NHR, a succinimide group, or substituted or unsubstituted benzyloxycarbonyl-NH-, wherein R and R¹ and the ring substituents are as defined hereinafter, (5) the C-terminus is replaced by -C(O)R² or -NR³R⁴ wherein R², R³ and R⁴ are as defined hereinafter, and
20 (6) conjugated peptides in which individual amino acid moieties are modified through treatment with agents capable of reacting with selected side chains or terminal residues Derivatives are further described hereinafter

The term "B1" means the bradykinin B1 receptor (see,
25 Judith M Hall, A review of BK receptors Pharmac Ther 56 131-190 (1992)) Unless specifically noted otherwise, B1 or bradykinin B1 receptor is intended to mean the human bradykinin B1 receptor (hB1) Preferably, hB1 is the wild-type receptor More preferably, hB1 is the
30 bradykinin receptor described in GenBank Accession no AJ238044

The term "peptide" as used generally herein refers to molecules of 4 to 40 amino acids, with molecules of 10 to 20 amino acids being preferred and those of 15 to 18 amino acids being most preferred. The term "di-peptide" as used
5 herein refers to a molecule of two amino acids. The term "tri-peptide" as used herein refers to a molecule of three amino acids.

Structural analysis of protein-protein interaction may also be used to suggest peptides that mimic the
10 binding activity of large protein ligands. In such an analysis, the crystal structure may suggest the identity and relative orientation of critical residues of the protein ligand from which an analogous peptide may be designed. See, for example, Takasaki et al, Nature
15 Biotech, Volume 15, pages 1266-1270 (1997). These analytical methods may also be used to investigate the interaction between a receptor protein and a peptide, vehicle-conjugated peptide, or PEG-conjugated peptide of the present invention, which may suggest further
20 modification of the peptide or peptide conjugates to increase binding affinity.

As used herein, the terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" when used with reference to a peptide, vehicle-conjugated peptide, or
25 PEG-conjugated peptide B1 antagonist refers to an amount or dosage sufficient to produce a desired result (i.e., for therapy with the peptides, vehicle-conjugated peptides, and/or PEG-conjugated peptide B1 antagonists of the present invention. In the context of the present
30 invention, the desired result is a desired reduction in inflammation and/or pain, for example, or to support an

observable decrease in the level of one or more biological activities of B1. More specifically, a therapeutically effective amount is an amount of the peptide and/or conjugated peptide sufficient to inhibit, for some period of time, one or more of the clinically defined pathological processes associated with the condition at issue, e.g., inflammation or pain, in a subject treated in vivo with the agent(s). The effective amount may vary depending on the specific peptide and/or conjugated peptide B1 antagonist selected, and is also dependent on a variety of factors and conditions related to the subject to be treated and the severity of the disorder. For example, if the peptide and/or conjugated peptide B1 antagonist is to be administered in vivo, factors such as the age, weight and health of the patient as well as dose response curves and toxicity data obtained in preclinical animal work would be among those considered. If the agent(s) is to be contacted with the cells in vitro, one would also design a variety of pre-clinical in vitro studies to assess such parameters as uptake, half-life, dose, toxicity, etc. The determination of an effective amount or a therapeutically effective amount for a given agent is well within the ability of those skilled in the art.

The term "pharmacologically active" means that a substance so described is determined to have activity that affects a medical parameter or disease state (for example, pain). In the context of the invention, this term typically refers to a B1-induced or B1-mediated disease or abnormal medical condition or disorder, and more specifically, to antagonism of inflammation or pain.

The terms "antagonist", "inhibitor", and "inverse agonist" (e g , see, Rianne A F de Ligt, et al, British Journal of Pharmacology 2000, 130, 131) refer to a molecule that blocks, impedes, reduces, lessens or in some way interferes with the biological activity of the associated protein of interest A preferred "antagonist" or "inhibitor" of the present invention is a molecule that binds to and inhibits B1 with an IC_{50} of 500 nM or less in in vitro assays of B1 activity A more preferred "antagonist" or "inhibitor" of the present invention is a molecule that binds to and inhibits B1 with an IC_{50} of 100 nM or less in in vitro assays of B1 activity A most preferred "antagonist" or "inhibitor" of the present invention is a molecule that binds to and inhibits B1 with an IC_{50} of 50 nM or less in in vitro assays of B1 activity and prevents, ameliorates or abolishes pain as measured in at least one generally accepted in vivo animal model of pain and/or inhibits biochemical challenges in in vivo animal models of edema, inflammation, or pain

Additionally, physiologically acceptable salts of the peptides or conjugated peptides of the invention are also encompassed herein The phrases "physiologically acceptable salts" and "pharmacologically acceptable salts" as used herein are interchangeable are intended to include any salts that are known or later discovered to be pharmaceutically acceptable (i e , useful in the treatment of a warm-blooded animal) Some specific examples are acetate, trifluoroacetate, hydrohalides, such as hydrochloride and hydrobromide, sulfate, citrate, tartrate, glycolate, oxalate, salts of inorganic and organic acids, including, but not limited to, hydrochloric

acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, phosphoric acid, methanesulphonic acid, ethanesulfonic acid, malic acid, acetic acid, oxalic acid, tartaric acid, citric acid, lactic acid, fumaric acid, succinic acid, maleic acid, 5 salicylic acid, benzoic acid, phenylacetic acid, mandelic acid and the like When compounds of the invention include an acidic function such as a carboxy group, then suitable pharmaceutically acceptable cation pairs for the carboxy group are well known to those skilled in the art 10 and include alkaline, alkaline earth, ammonium, quaternary ammonium cations and the like For additional examples of "pharmacologically acceptable salts," see *infra* and Berge et al , J Pharm Sci 66 1 (1977)

"Protecting group" generally refers to groups well 15 known in the art which are used to prevent selected reactive groups, such as carboxy, amino, hydroxy, mercapto and the like, from undergoing undesired reactions, such as nucleophilic, electrophilic, oxidation, reduction and the like Preferred protecting groups are indicated herein 20 where appropriate Examples of amino protecting groups include, but are not limited to, aralkyl, substituted aralkyl, cycloalkenylalkyl and substituted cycloalkenyl alkyl, allyl, substituted allyl, acyl, alkoxycarbonyl, aralkoxycarbonyl, silyl and the like Examples of aralkyl 25 include, but are not limited to, benzyl, ortho-methylbenzyl, trityl and benzhydryl, which can be optionally substituted with halogen, alkyl, alkoxy, hydroxy, nitro, acylamino, acyl and the like, and salts, such as phosphonium and ammonium salts Examples of aryl groups include phenyl, naphthyl, 30 indanyl, anthracenyl, 9-(9-phenylfluorenyl), phenanthrenyl, durenyl and the like Examples of cycloalkenylalkyl or

substituted cycloalkylenylalkyl radicals, preferably have 6-10 carbon atoms, include, but are not limited to, cyclohexenyl methyl and the like. Suitable acyl, alkoxy carbonyl and aralkoxy carbonyl groups include

5 benzyloxycarbonyl, t-butoxycarbonyl, iso-butoxycarbonyl, benzoyl, substituted benzoyl, butyryl, acetyl, tri-fluoroacetyl, tri-chloro acetyl, phthaloyl and the like. A mixture of protecting groups can be used to protect the same amino group, such as a primary amino group can be protected

10 by both an aralkyl group and an aralkoxy carbonyl group. Amino protecting groups can also form a heterocyclic ring with the nitrogen to which they are attached, for example, 1,2-bis(methylene)benzene, phthalimidyl, succinimidyl, maleimidyl and the like and where these heterocyclic groups

15 can further include adjoining aryl and cycloalkyl rings. In addition, the heterocyclic groups can be mono-, di- or tri-substituted, such as nitrophthalimidyl. Amino groups may also be protected against undesired reactions, such as

20 oxidation, through the formation of an addition salt, such as hydrochloride, toluenesulfonic acid, trifluoroacetic acid and the like. Many of the amino protecting groups are also suitable for protecting carboxy, hydroxy and mercapto groups. For example, aralkyl groups. Alkyl groups are also

25 suitable groups for protecting hydroxy and mercapto groups, such as tert-butyl.

Silyl protecting groups are silicon atoms optionally substituted by one or more alkyl, aryl and aralkyl groups. Suitable silyl protecting groups include, but are not limited to, trimethylsilyl, triethylsilyl,

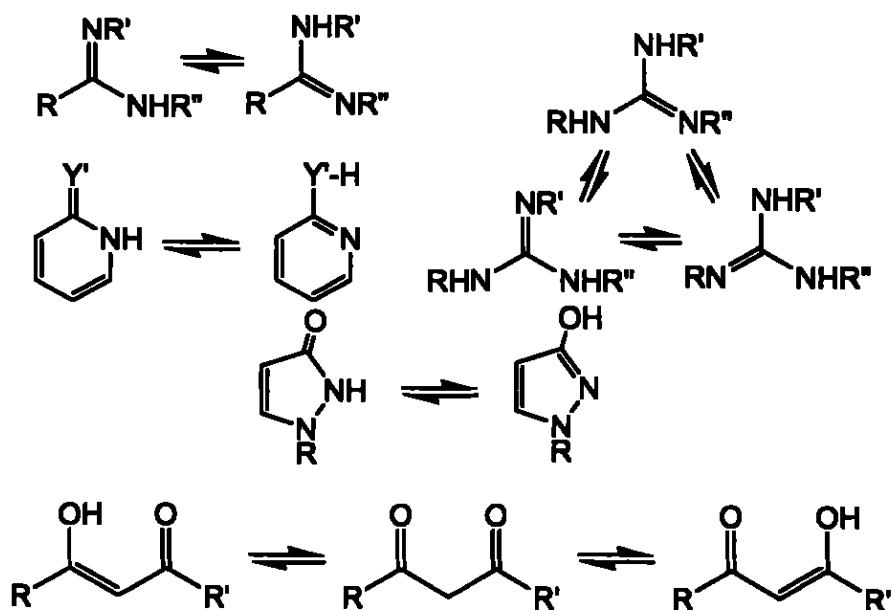
30 tri-isopropylsilyl, tert-butyl dimethylsilyl, dimethylphenylsilyl, 1,2-bis(dimethylsilyl)benzene,

1,2-bis(dimethylsilyl)ethane and diphenylmethylsilyl
Silylation of an amino groups provide mono- or di-
silylamino groups Silylation of aminoalcohol compounds
can lead to a N,N,O-tri-silyl derivative Removal of the
5 silyl function from a silyl ether function is readily
accomplished by treatment with, for example, a metal
hydroxide or ammonium fluoride reagent, either as a
discrete reaction step or in situ during a reaction with
the alcohol group Suitable silylating agents are, for
10 example, trimethylsilyl chloride, tert-butyl-dimethylsilyl
chloride, phenyldimethylsilyl chloride, diphenylmethyl
silyl chloride or their combination products with
imidazole or DMF Methods for silylation of amines and
removal of silyl protecting groups are well known to those
15 skilled in the art Methods of preparation of these amine
derivatives from corresponding amino acids, amino acid
amides or amino acid esters are also well known to those
skilled in the art of organic chemistry including amino
acid/amino acid ester or aminoalcohol chemistry
20 Protecting groups are removed under conditions which
will not affect the remaining portion of the molecule
These methods are well known in the art and include acid
hydrolysis, hydrogenolysis and the like A preferred
method involves removal of a protecting group, such as
25 removal of a benzyloxycarbonyl group by hydrogenolysis
utilizing palladium on carbon in a suitable solvent system
such as an alcohol, acetic acid, and the like or mixtures
thereof A t-butoxy-carbonyl protecting group can be
removed utilizing an inorganic or organic acid, such as
30 HCl or trifluoroacetic acid, in a suitable solvent system,
such as dioxane or methylene chloride The resulting

amino salt can readily be neutralized to yield the free amine. Carboxy protecting group, such as methyl, ethyl, benzyl, tert-butyl, 4-methoxyphenylmethyl and the like, can be removed under hydrolysis and hydrogenolysis

5 conditions well known to those skilled in the art

It should be noted that compounds of the invention may contain groups that may exist in tautomeric forms, such as cyclic and acyclic amidine and guanidine groups, heteroatom substituted heteroaryl groups ($Y' = O, S, NR$),
 10 and the like, which are illustrated in the following examples



15 and though one form is named, described, displayed and/or claimed herein, all the tautomeric forms are intended to be inherently included in such name, description, display and/or claim

Prodrugs of the compounds of this invention are also
 20 contemplated by this invention. A prodrug is an active or inactive compound that is modified chemically through in vivo physiological action, such as hydrolysis, metabolism

and the like, into a compound of this invention following administration of the prodrug to a patient. The suitability and techniques involved in making and using prodrugs are well known by those skilled in the art. For a general discussion of prodrugs involving esters see Svensson and Tunek Drug Metabolism Reviews 165 (1988) and Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985). Examples of a masked carboxylate anion include a variety of esters such as alkyl (for example, methyl, ethyl), cycloalkyl (for example, cyclohexyl), aralkyl (for example, benzyl, p-methoxybenzyl), and alkylcarbonyloxyalkyl (for example, pivaloyloxymethyl). Amines have been masked as arylcarbonyloxymethyl substituted derivatives which are cleaved by esterases in vivo releasing the free drug and formaldehyde (Bundgaard J Med Chem 2503 (1989)). Also, drugs containing an acidic NH group, such as imidazole, imide, indole and the like, have been masked with N-acyloxymethyl groups (Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985)). Hydroxy groups have been masked as esters and ethers. EP 039,051 (Sloan and Little, 4/11/81) discloses Mannich-base hydroxamic acid prodrugs, their preparation and use.

Structure of conjugated peptides

25

In General The vehicle-conjugated peptides of the present invention may be described by the following formula



wherein

X^1 and Y^1 are independently in each instance peptides of the formula $-L^1-P^1$ and $-L^2-P^2$, respectively,

F is a vehicle covalently bound to X^1 or Y^1 ,

5 L^1 and L^2 are independently in each instance absent or linkers having from 0 to 9 amino acid residues,

n is 0 to 3, and

P^1 and, if present, P^2 are independently in each instance peptide antagonists of the bradykinin B1
10 receptor

The vehicle-conjugated peptides of formula IV will comprise preferred embodiments wherein P^1 and, if present, P^2 are independently in each instance peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor having a peptide sequence as
15 shown in any one of SEQ ID NOS 5-60 and derivatives thereof

Additional preferred embodiments of the vehicle-conjugated peptides will include vehicle-conjugated peptides of formula IV wherein P^1 and, if present, P^2 is
20 defined by the formula



wherein

a^0 is a basic or neutral aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acid, di-peptide or tri-peptide containing either one or two residues having basic
25 side chains, or absent,

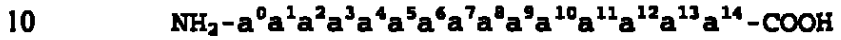
a^1 , a^2 , a^3 and a^4 are independently in each instance basic or neutral aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acids,

30 a^5 is Ser,

a⁵, a⁷, and a⁸ are independently in each instance aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acids, provided that at least one of a⁵, a⁷, and a⁸ is selected from Chg, Cpg, Igla, Iglb, Niga and Nigb of the D- or L- configuration, and

a⁹, a¹⁰, a¹¹, a¹², a¹³, and a¹⁴ are independently in each instance any natural amino acid or absent

More preferably, P¹ and, if present, P² are defined by the formula



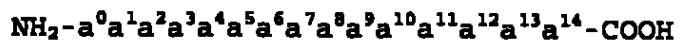
wherein

a⁰ is a basic amino acid, a di-peptide containing either one or two residue with basic side chains, or absent,

15 a¹ is a basic amino acid,
 a² is Pro,
 a³ is Hyp,
 a⁴ is Gly,
 a⁵ and a⁶ is an Indanyl amino acid,

20 a⁶ is Ser,
 a⁷ is a D-Indanyl amino acid,
 a⁸ is Cpg, and
 a⁹, a¹⁰, a¹¹, a¹², a¹³, and a¹⁴ are independently in each instance any natural amino acid or absent

25 Even more preferably, P¹ and, if present, P² are defined by the formula



wherein

a⁰ is a basic amino acid, di-peptide containing either

30 one or two basic side chains, or absent,
 a¹ is a basic amino acid,

a^2 is Pro,
 a^3 is Hyp,
 a^4 is Gly,
 a^5 is Cpg,
5 a^6 is Ser,
 a^7 is DTic,
 a^8 is Cpg, and
 a^9 , a^{10} , a^{11} , a^{12} , a^{13} , and a^{14} are independently in each
instance any natural amino acid or absent

10 Even more preferably, vehicle-conjugated peptides of
the present invention include vehicle-conjugated peptides
of formula IV wherein $n=0$ and X^1 is a peptide selected from
the group consisting of peptides as shown in SEQ ID NOS
27-41 and derivatives thereof

15 The present invention also provides PEG-conjugated
peptides which bind to and antagonize the activity of
bradykinin B1 receptors (B1) and which have demonstrably
superior pharmacokinetic properties in vivo as compared to
unconjugated peptide B1 antagonists The PEG-conjugated
20 peptides of the present invention may be described by the
following formula (V)



wherein

X^1 and Y^1 are independently in each instance peptides
25 of the formula $-L^1-P^1$ and $-L^2-P^2$, respectively,

F is a PEG moiety covalently bound to X^1 or Y^1 ,

L^1 and L^2 are independently in each instance absent or
linkers having from 0 to 9 amino acid residues,

n is 0 to 3, and

P¹ and, if present, P² are independently in each instance peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor

The PEG-conjugated peptides of formula V will
 5 comprise preferred embodiments wherein P¹ and, if present, P² are independently in each instance peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor having a peptide sequence as shown in any one of SEQ ID NOS 5-60 and derivatives thereof

10 Additional preferred embodiments of the PEG-conjugated peptides will include PEG-conjugates of formula V wherein P¹ and, if present, P² is defined by the formula



wherein

15 a⁰ is a basic or neutral aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acid, basic di-peptide or tri-peptide, or absent,

a¹, a², a³ and a⁴ are independently in each instance basic or neutral aromatic, aliphatic, heterocyclic, or
 20 alicyclic amino acids,

a⁶ is Ser,

a⁵, a⁷, and a⁸ are aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acids, provided that at least one of a⁵, a⁷, and a⁸ is selected from Chg, Cpg, Igl_a, Igl_b, Niga and
 25 Nigh of the D- or L- configuration, and

a⁹, a¹⁰, a¹¹, a¹², a¹³, and a¹⁴ are independently in each instance any natural amino acid or absent

More preferably, P¹ and, if present, P² are defined by the formula



wherein

a^0 is a basic amino acid, a basic di-peptide or absent,

a^1 is a basic amino acid,

a^2 is Pro,

5 a^3 is Hyp,

a^4 is Gly,

a^5 and a^8 is an Indanyl amino acid,

a^6 is Ser,

a^7 is a D-Indanyl amino acid,

10 a^8 is Cpg, and

a^9 , a^{10} , a^{11} , a^{12} , a^{13} , and a^{14} are independently in each instance any natural amino acid or absent

Even more preferably, P^1 and, if present, P^2 are defined by the formula

15
$$\text{NH}_2\text{-}a^0a^1a^2a^3a^4a^5a^6a^7a^8a^9a^{10}a^{11}a^{12}a^{13}a^{14}\text{-COOH}$$

wherein

a^0 is a basic amino acid, a basic di-peptide, or absent,

a^1 is a basic amino acid,

20 a^2 is Pro,

a^3 is Hyp,

a^4 is Gly,

a^5 is Cpg,

a^6 is Ser,

25 a^7 is DTic,

a^8 is Cpg, and

a^9 , a^{10} , a^{11} , a^{12} , a^{13} , and a^{14} are independently in each instance any natural amino acid or independently absent

Even more preferred PEG-conjugated peptides of the present invention include PEG-conjugated peptides of
30 formula V wherein $n=0$ and X^1 is a peptide selected from the

group consisting of peptides having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NOS 27-41 and derivatives thereof. Even more preferred PEG-conjugated peptides of the present invention include wherein $n=0$ and X^1 is a peptide selected from the group consisting of peptides having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NOS 27-41 and derivatives thereof. Even more preferably, the PEG-conjugated peptides of the present invention may be described by the following formula

10 $F'-R_n$, VI

or a physiologically acceptable salt thereof wherein

F' is a multivalent vehicle,

R is independently in each instance $-(X^1)-(Y^1)_n$

wherein R is covalently bound to F' ,

15 X^1 and Y^1 are independently in each instance peptides of the formula $-L^1-P^1$ and $-L^2-P^2$, respectively,

L^1 and L^2 are independently in each instance absent or linkers having from 0 to 9 amino acid residues,

n is 0 to 3,

20 Z is 2 to 8, and

P^1 and P^2 are independently in each instance peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor

Even more preferred PEG-conjugated peptides of the present invention include PEG-conjugated peptides of

25 formula VI wherein n is 0, Z is 4 to 8, and X^1 is a peptide selected from the group consisting of peptides having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NOS 27-41 and derivatives thereof

Also intended as part of the present invention are
30 peptide conjugates having peptide sequences that are fragments (i.e., "subsequences"), analogs, and derivatives

of P^1 and, if present, P^2 as defined herein and wherein such conjugated peptides are substantially equivalent with respect to *in vitro* and/or *in vivo* anti-B1 activity as the peptide conjugates specifically disclosed herein

5 The term "analog" is intended to mean molecules representing one or more amino acid substitutions, deletions and/or additions derived from the linear array of amino acids of the peptides, conjugated-peptides (unconjugated P^1 and, if present, P^2), and/or any peptidyl
10 linker (L) of the vehicle- or PEG-conjugated peptides provided for by the formulas (IV) and (V), respectively, and which result in molecules which are substantially equivalent with respect to *in vitro* and/or *in vivo* anti-B1 activity as compared to an analogous unconjugated peptide
15 or conjugated peptide specifically disclosed herein

 The conjugated peptide analogs in accordance with this invention will typically have one or more amino acid substitutions, deletions and/or insertions in the sequence of (P) (P^1 and/or, if present, P^2) or (L) (L^1 and/or, if
20 present, L^2) It is generally recognized that conservative amino acid changes are least likely to perturb the structure and/or function of a polypeptide and generally involve substitution of one amino acid with another that is similar in structure and/or function (e g , amino acids
25 with side chains similar in size, charge and/or shape) The nature of these substitutions are well known to one skilled in the art and exemplary amino acid substitutions are summarized in Tables 1 and 2

30

Table 1 Amino Acid Substitutions**Basic**

Arg, Lys, His,

Acidic

Glu, Asp

Polar

Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr

Hydrophilic

Asp, Glu, Asn, Ser, Thr, Tyr

Hydrophobic:

Ala, Met, Ile, Leu, nor-Leu, Val

Aromatic

Phe, Trp, Tyr

Small

Gly, Ala, Ser, Thr, Met

Table 2 Amino Acid Substitutions

<u>Amino Acid</u>	<u>Preferred Substitutions</u>	<u>Most Preferred Substitution</u>
Ala	Gly, Leu, Ile, Asn, Pro	Val
Arg	Ala, Asn, Gln, Ser	Lys
Asn	Arg, Gln, His, Lys, Ser, Tyr	Gln
Asp	Asn, Ser, Thr, Gln	Glu
Cys	Ala	Ser
Gln	Ala, Arg, Glu, Leu, Lys, Met, Ser, Tyr	Asn
Glu	Gln, Ser, Thr, Asn	Asp
Gly		Pro
His	Asn, Gln, Lys, Tyr, Phe	Arg
Ile	Tyr, Val, Met, Ala, Phe, nor-Leu	Leu
Leu	nor-Leu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Asn, Asp, Ala, Glu, Gln, Ser, Tyr	Arg
Met	Ala, Gln, Tyr, Trp, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Met	Leu
Pro	Ile, Val	Gly
Ser	Ala, Asn, Asp, Gly, Lys	Thr
Thr	Ala, Gly, Ile, Val, Lys	Ser
Trp	Phe, Tyr, His	Tyr
Tyr	Trp, Thr, Ser	Phe
Val	Ala, Ile, Met, Phe, Tyr, nor-Leu	Leu

5 Changing from A, F, H, I, L, M, P, V, W, or Y to C is more preferred if the new cysteine remains as a free thiol

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the peptide sequence, or to increase or decrease the affinity of the unconjugated and/or conjugated peptide molecules described herein.

In certain embodiments, conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues which are typically incorporated by chemical peptide synthesis

5 As noted in the foregoing section, naturally occurring residues may be divided into classes based on common side chain properties that may be useful for modifications of sequence. For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one
10 of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the peptide that are homologous with non-human orthologs, or into the non-homologous regions of the molecule. In addition, one may also make modifications using P or G for
15 the purpose of influencing chain orientation.

In making such modifications, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of their hydrophobicity and charge characteristics, these are
20 isoleucine (+4.5), valine (+4.2), leucine (+3.8), phenylalanine (+2.8), cysteine/cystine (+2.5), methionine (+1.9), alanine (+1.8), glycine (-0.4), threonine (-0.7), serine (-0.8), tryptophan (-0.9), tyrosine (-1.3), proline (-1.6), histidine (-3.2), glutamate (-3.5), glutamine (-
25 3.5), aspartate (-3.5), asparagine (-3.5), lysine (-3.9), and arginine (-4.5).

The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is understood in the art. Kyte et al, J Mol Biol, 157
30 105-131 (1982). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar

hydropathic index or score and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydropathic index, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those
5 which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity. The greatest local average
10 hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, i.e., with a biological property of the protein.

The following hydrophilicity values have been
15 assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 $\pm$ 1); glutamate (+3.0 $\pm$ 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 $\pm$ 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3);
20 valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4). In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those which are within
25 ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. One may also identify epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. These regions are also referred to as "epitopic core regions."

30 A skilled artisan will be able to determine suitable analogs of the unconjugated and/or conjugated peptides set

forth herein using well known techniques One skilled in the art would also know that one may substitute chemically similar amino acids for residues occurring in the native peptide while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions) Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the unconjugated peptide or conjugated peptide structure

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues within the unconjugated and/or conjugated peptide sequence that are important for activity or structure In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in a peptide sequence One skilled in the art may opt to substitute chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of unconjugated and/or conjugated peptides of the present invention

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure See Moult J , Curr Op in Biotech , 7(4) 422-427 (1996), Chou et al , Biochemistry, 13(2) 222-245 (1974), Chou et al , Biochemistry, 113(2) 211-222 (1974), Chou et al , Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol , 47 45-148 (1978), Chou et al , Ann Rev Biochem , 47 251-276 and Chou et al , Biophys J , 26 367-384 (1979) Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure

Additional methods of predicting secondary structure include "threading" (Jones, D , Curr Opin Struct Biol , 7(3) 377-87 (1997), Sippl et al , Structure, 4(1) 15-9 (1996)), "profile analysis" (Bowie et al , Science, 253 164-170 (1991), Gribskov et al , Meth Enzym , 183 146-159 (1990), Gribskov et al , Proc Nat Acad Sci , 84(13) 4355-8 (1987)), and "evolutionary linkage" (See Home, supra and Brenner, supra)

Peptide and/or conjugated peptide analogs and derivatives in accordance with the invention will be useful for the same purposes for which the analogous peptides and/or conjugated peptides specifically disclosed herein are useful (i e , antagonists of B1 activity in vitro and/or in vivo)

Peptides Peptides of the present invention include peptides comprising the sequences shown in SEQ ID NOS 15-35 and 39-54 The peptide sequences P¹ and, if present, P² (P) within the vehicle- or PEG-conjugated peptides of the present invention include, as mentioned, peptides that bind to and antagonize (e g , decrease) the activity of B1 Preferred vehicle- or PEG-conjugated peptides of the present invention comprise at least one peptide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS 5-60 and derivatives thereof More preferably, vehicle- or PEG-conjugated peptides of the present invention comprise at least one peptide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS 27-41 and derivatives thereof

Table 3 - Bradykinin Peptides

Receptor/Effect	Peptide	Peptide Sequence							
B2/B1 Agonist	Bradykinin BK (SEQ ID NO 1)		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro Phe Arg
B2 Agonist	Kallidin Lys BK (SEQ ID NO 2)	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro Phe Arg
B2 Agonist	Met Lys BK (SEQ ID NO 3)	Met Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro Phe Arg
B1 Agonist	des Arg BK (SEQ ID NO 4)		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro Phe
B1 Antagonist	[Leu8] Des-Arg8 BK (SEQ ID NO 5)		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro Leu
B1 Antagonist	DALK (SEQ ID NO 6)	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro Leu
B2 Antagonist	(SEQ ID NO 7)	DArg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Thi	Ser	Dtic Oic Arg
B1/B2 Antagonist	(SEQ ID NO 8)	DArg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Thi	Ser	Dtic Oic
B2 Antagonist	(SEQ ID NO 9)	DArg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Thi	Ser	Dtpe Oic Arg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 10)	Ac Lys Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	D β Nal Ile
B1/B2 Antagonist	(SEQ ID NO 11)		DArg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser Digt Oic Arg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 12)	Lys Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser	Digt Oic
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 13)	Lys Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1/B2 Antagonist	(SEQ ID NO 14)		DArg	Arg	Pro	Hyp	Gly	Igl	Ser Df5f Igl Arg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 15)	DOrnLys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 16)	DOrnLys	Arg	Pro	Thz	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 17)	3PalLys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 18)	4PalLys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 19)	Cha	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 20)	2 Nal Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 21)	Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 22)	DLysLys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 23)	Lys DOrn	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 24)	Lys Cha	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 25)	Lys Abu	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 26)	Lys 2 Nal Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 43)	Dab Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 44)	Ac Dab Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 45)	DOrnLys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic Cpg

B1 Antagonist	(SEQ ID NO 46)	Ac	D Orn Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg
			D								
			3 Pa								
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 47)		1 Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg
			D								
			3 Pa								
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 48)	Ac	1 Lys	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic	Cpg
			D								
			D 2								
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 49)		Lys	NaI	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic
			D 2								
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 50)		Lys	NaI	Arg	Pro	Hyp	Gly	Cpg	Ser	Dtic
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 51)			D Orn	Arg	Oic	Pro	Gly	Phe	Ser	D-β-NaI Ile
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 52)	Ac		D Orn	Arg	Oic	Pro	Gly	Phe	Ser	D β NaI Ile
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 53)		D Orn	Lys	Arg	Oic	Pro	Gly	Phe	Ser	D β NaI Ile
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 54)	Ac	D Orn Lys	Arg	Oic	Pro	Gly	Phe	Ser	D β NaI Ile	
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 55)		Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	D β NaI Ile	
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 56)	Ac	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	D-β NaI Ile	
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 57)		Orn	Arg	Oic	Pro	Gly	Phe	Ser	D β NaI Ile	
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 58)	Ac	Orn	Arg	Oic	Pro	Gly	Phe	Ser	D β NaI Ile	
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 59)		Lys	Arg	Oic	Pro	Gly	Phe	Ser	D β NaI Ile	
B1 Antagonist	(SEQ ID NO 60)	Ac	Lys	Arg	Oic	Pro	Gly	Phe	Ser	D β NaI Ile	

Vehicles The term "vehicle" as used herein refers to a molecule that prevents degradation and/or increases half-life, reduces toxicity, reduces immunogenicity, or increases biological activity of a therapeutic peptide or protein. Vehicles useful in the context of the present invention are known in the art (for example, see PCT Publication WO 98/07746, which is hereby incorporated by reference in their entirety) and are all readily available to those skilled in the art. In the context of the present invention, preferred vehicles include, but are not limited to, polymethylethylene- glycol, polyhydroxypropyleneglycol, polypropyleneglycols and oxides, polymethylpropyleneglycol, polyhydroxypropyleneoxide, straight-chain and branched-chain polypropyleneglycols and derivatives thereof, polyethyleneglycol and polypropyleneglycol and the

monomethyl ethers, monocetyl ethers, mono-n-butyl ethers, mono-t-butylethers and monooley ethers thereof, esters of polyalkyleneglycols with carboxylic acids and dehydration condensation products of the polyalkyleneglycols with
5 amines and other polyalkylene oxides and glycols and derivatives thereof, poly (vinylpyrrolidone), polyvinyl alcohol, poly (vinyl acetate), the copolymer poly (vinyl acetate-co-vinyl alcohol), polyvinylloxazolidone, poly (vinylmethyloxazolidone and poly (vinyl methyl ether),
10 poly(acrylic acid)s, poly(methacrylic acid)s, polyhydroxyethylmethacrylates, Poly(acrylamide and poly(methacrylamide) and other amides - thereof, poly(N,N-dimethylacrylamide), poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-acetamidoacrylamide) and poly(N-acetamidomethacrylamide,
15 and other N-substituted derivatives of the amides

One aspect of the invention requires the presence of at least one vehicle (F) attached to a non-peptidyl linker moiety or an amino acid residue of a peptidyl linker that is covalently fused to a peptide B1 antagonist In the
20 context of the present invention, a preferred vehicle constitutes a PEG molecule, as defined herein An even more preferred vehicle constitutes a multivalent PEG molecule, as defined herein

The vehicle- or PEG-conjugated molecules specifically
25 disclosed or referenced herein may be slightly modified within the regions denoted by $(X^1)-(Y^1)_n$ (as defined *supra*) to form an analog in accordance with the invention, provided that antagonism of B1 is substantially maintained

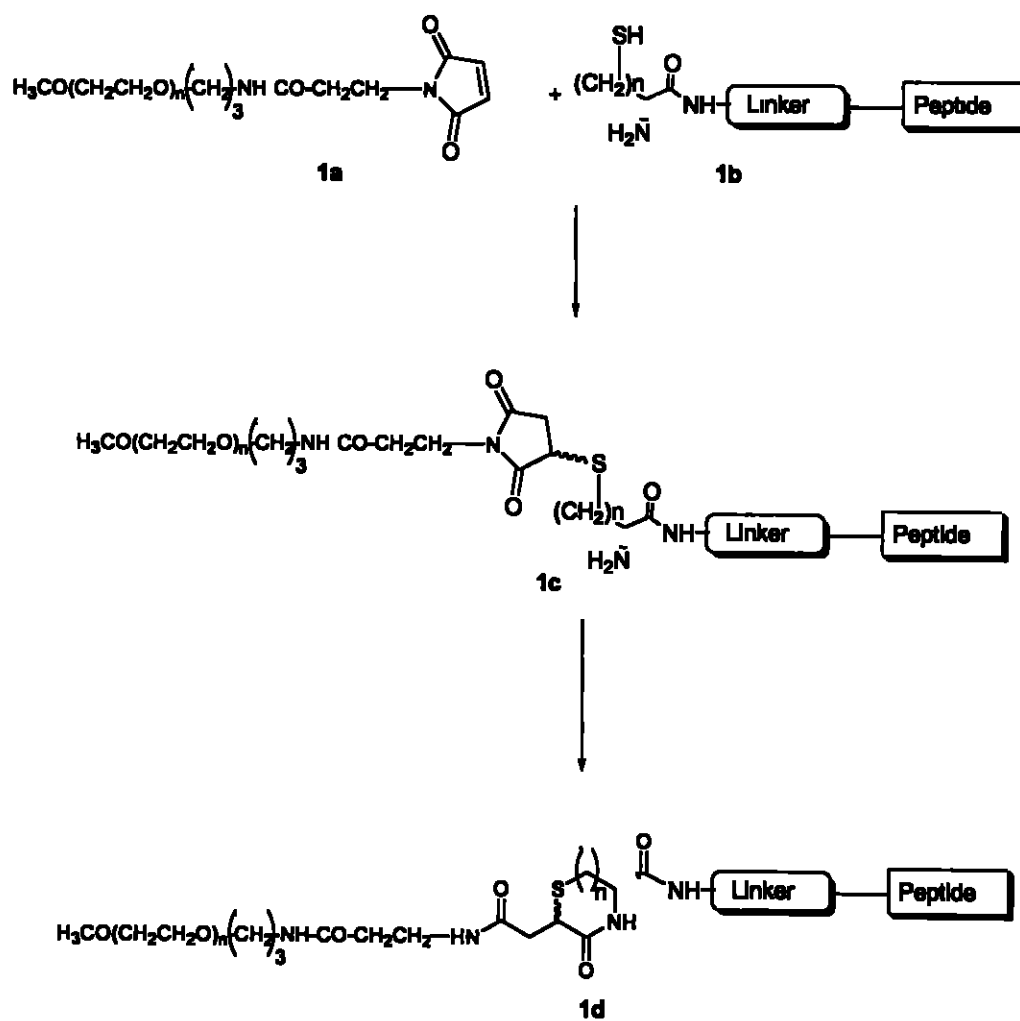
30 As between the vehicle- or PEG-conjugated peptides of the present invention and analogs thereof, it is

preferable that no more than three non-terminal residues in the (P) region are different. More preferably, analogs contemplated by the present invention include molecules with up to two amino acid substitutions, insertions, or deletions at any particular non-terminal locus of the (P) region of the vehicle- or PEG-conjugated peptide of the present invention. Most preferably, the divergence in sequence between a vehicle- or PEG-conjugated peptide of the present invention and a contemplated analog thereof, particularly in the specified (P) region, is in the form of one or more "conservative modifications"

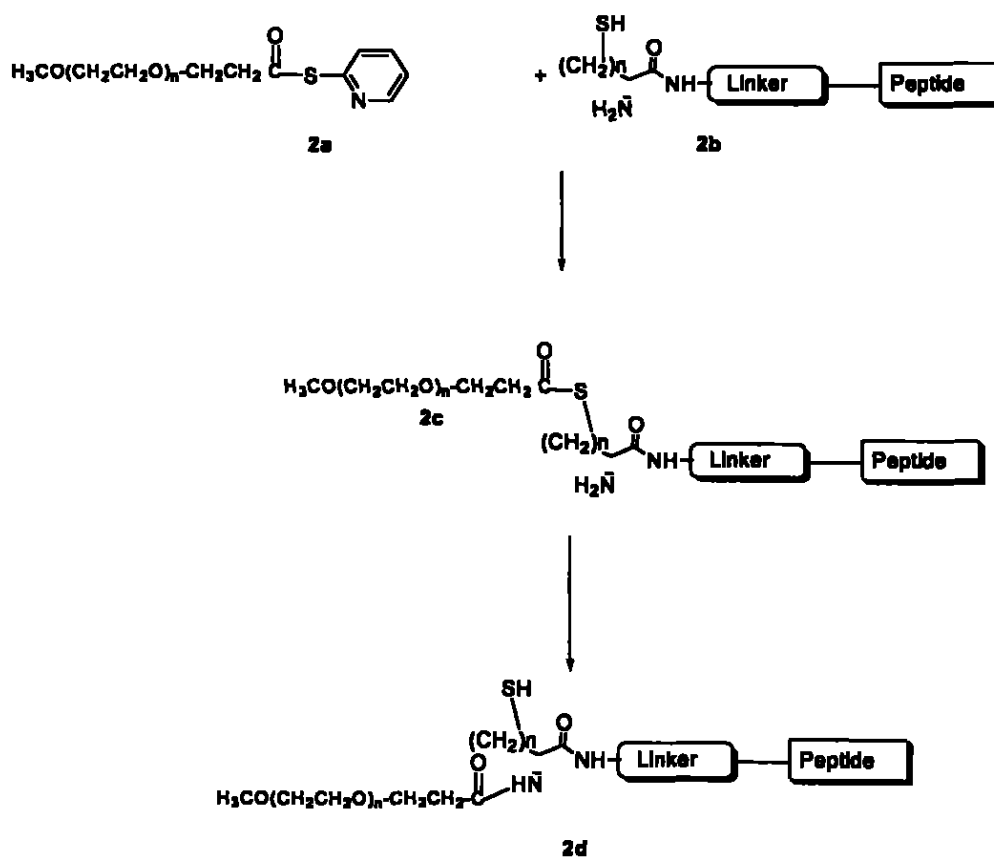
Linkers The term "linker" as used herein refers to L¹ and, if present, L² as shown in either formula IV and V (*supra*) and is abbreviated herein by (L). Preferably, (L) is peptidyl in nature (i.e., made up of amino acids linked together by peptide bonds) and made up of from 1 to 9 amino acids. More preferably, (L) is made up of from 1 to 9 amino acids, wherein the amino acids are selected from the twenty naturally occurring amino acids. In an even more preferred embodiment the 1 to 9 amino acids of the peptidyl linker are selected from cysteine, glycine, alanine, proline, arginine, asparagine, glutamine, and lysine. Even more preferably, a peptidyl linker is made up of a majority of amino acids that are sterically unhindered, such as glycine and alanine linked by a peptide bond. Thus, preferred peptidyl linkers are poly(Gly)₁₋₉, particularly (Gly)₃ (SEQ ID NO 100), (Gly)₅ (SEQ ID NO 101) and (Gly)₇ (SEQ ID NO 102), as well as poly(Gly-Ala)₂₋₄ and poly(Ala)₁₋₉. Other specific examples of peptidyl linkers include (Gly)₅Lys (SEQ ID NO 103), and

(Gly)₅LysArg (SEQ ID NO 104) Other combinations of Gly and Ala are also preferred To explain the above nomenclature, for example, (Gly)₅Lys means Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys A peptidyl linker may contain a N-terminal cysteine, another thiol, or nucleophile for conjugation with a vehicle A more preferred linker contains an N-terminal cysteine or homocysteine residue, or other 2-amino-ethanethiol or 3-amino-propanethiol moiety for conjugation to maleimide, iodoacetaamide or thioester, functionalized vehicles Treatment of the initial 3-sulfanyl succinimide adduct (1c) formed by the reaction of a peptide with maleimide activated PEG, with excess base converts the less stable succinimide adduct to the hydrolytically stable 6-methylcarbamoyl-5-oxo-thiomorpholine-3-carboxamide form (1d, Scheme 1) Alternatively, commercially available thioester or iodoacetamido PEGs (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) may be used for chemoselective conjugation as depicted in Schemes 2 and 3

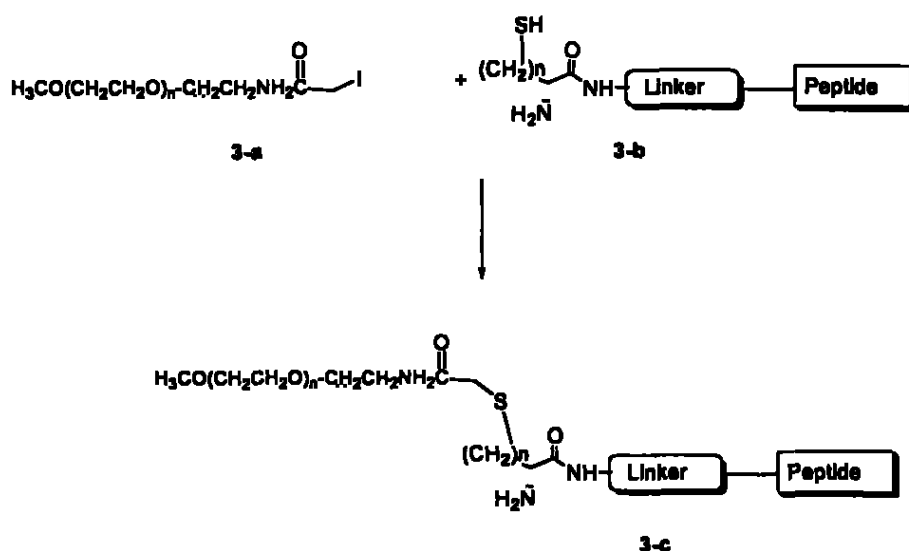
SCHEME 1



Scheme 2



Scheme 3

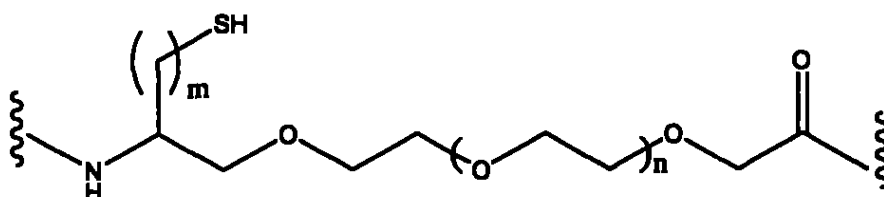
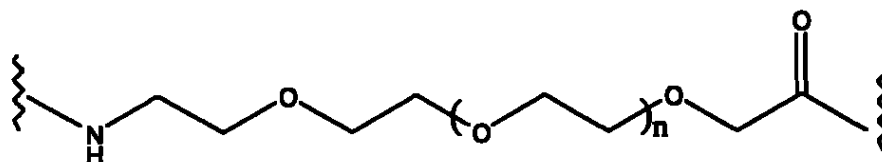


Another preferred linker is a large, flexible linker comprising a random Gly/Ser/Thr sequence

5 (GSGSATGGSGSTASSGSGSATH, SEQ ID NO 105) that is estimated to be about the size of a 1k PEG molecule. Additionally, a peptidyl linker may comprise a non-peptidyl segment such as a 6 carbon aliphatic molecule of the formula -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂- (Rigid linker -AEAAAKEAAAKEAAKAGG-)

10 Alternatively, a non-peptidyl linker containing a reactive nucleophile may be present in X¹ and, if present, Y¹. For example, alkyl linkers such as -NH-(CH₂)_s-C(O)-, wherein s = 2-20 could be used. These alkyl linkers may further be substituted by any non-sterically hindering

15 group such as lower alkyl (e.g., C₁-C₆), lower acyl, halogen (e.g., Cl, Br), CN, NH₂, phenyl, etc. Exemplary non-peptidyl linkers are the PEG linkers (shown below)



5

wherein n is such that the linker has a molecular weight of 100 to 5000 kilodaltons (kD), preferably 100 to 500 kD
 m is = 1-3 Preferably, a non-peptidyl linker is aromatic The linkers may be altered to form derivatives
 10 in the same manner as described herein

In addition, PEG moieties may be attached to the N-terminal amine or selected side chain amines by either reductive alkylation using PEG aldehydes or acylation using hydroxysuccinimido or carbonate esters of PEG Any
 15 of the linkers described above may be used in this approach Alternatively, a suitably functionalized PEG may be attached directly to any of the peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor as shown as SEQ ID NOS 5-26 or SEQ ID NOS 43-60 or directly to an amino acid residue
 20 of a peptidyl linker that is covalently fused to any of the peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor as shown as SEQ ID NOS 5-26 or 43-60

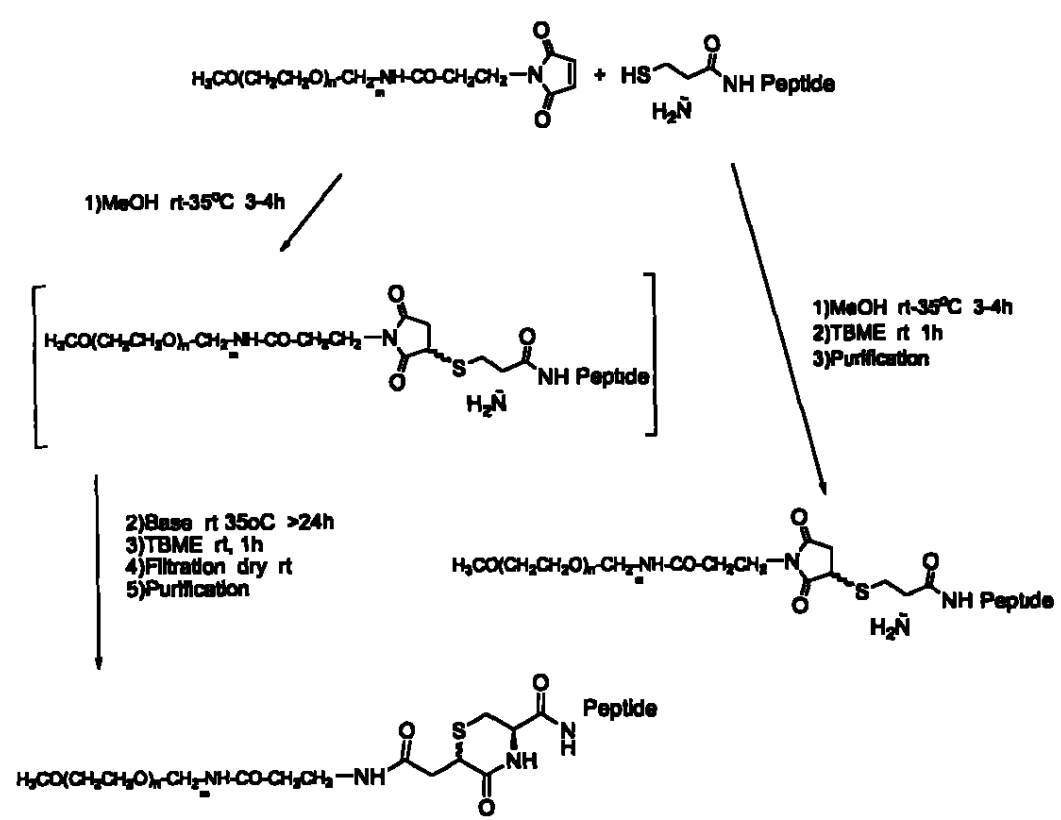
It will be appreciated that, since the vehicle and/or the target peptides may be multivalent, it is possible by
 25 the process of the invention to produce a variety of vehicle peptide structures By way of example, a univalent

vehicle and a univalent peptide will produce a 1 1
conjugate, a bivalent peptide and a univalent vehicle may
form conjugates wherein the peptide conjugates bear two
vehicle moieties whereas a bivalent vehicle and a
5 univalent peptide may produce species where two peptide
entities are linked to a single vehicle moiety, use of
higher-valent vehicles can lead to the formation of
clusters of peptide entities bound to a single vehicle
moiety whereas higher-valent peptides may become encrusted
10 with a plurality of vehicle moieties The peptide
moieties may have more than one reactive group which will
react with the activated vehicle and the possibility of
forming complex structures must always be considered, when
it is desired to form simple structures such as 1 1
15 adducts of vehicle and peptide, or to use bivalent
vehicles to form peptide vehicle peptide adducts, it will
be beneficial to use predetermined ratios of activated
vehicle and peptide material, predetermined concentrations
thereof and to conduct the reaction under predetermined
20 conditions (such as duration, temperature, pH etc) so as
to form a proportion of the described product and then to
separate the described product from the other reaction
products The reaction conditions, proportions and
concentrations of the reagents can be obtained by
25 relatively simple trial-and-error experiments which are
within the ability of an ordinarily skilled artisan with
appropriate scaling-up as necessary Purification and
separation of the products is similarly achieved by
conventional techniques well known to those skilled in the
30 art However, as used in the specification and the
appended claims, the singular forms "a", "an", and "the"

include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a vehicle-conjugated peptide antagonist" or "a PEG-conjugated peptide antagonist" includes mixtures of such conjugates and reference to "the method of treatment" includes reference to one or more methods of treatment of the type which will be known to those skilled in the art or will become known to them upon reading this specification, and so forth

10 Conventional PEGylations through the conjugation of mPEG-maleimide with thiol group of peptides and polypeptides having cysteine amino acid residues are run in phosphate buffer with or without organic solvent. The high solubility of PEGylated peptides and polypeptides and potential instability of the pyrrolidin-2,5-dione ring in water have hampered the application of this method to large scale production and purification of PEGylated peptides and proteins. Therefore, we disclose here a novel non-aqueous conditions for the conjugation of mPEG-
15 maleimide with thiol group of peptides and polypeptides having cysteine residues. The novel process results in moderate to high yields of PEGylated peptides and polypeptides and combines the Michael addition and aminolysis into one-pot (Scheme 4). Both conditions
20 result in direct isolation of PEGylated peptides and polypeptides through a precipitation

Scheme 4



5

In another embodiment of the process depicted in Scheme 4, in conjunction with any of the above or below embodiments, methanol (MeOH) may be substituted with a solvent comprising one or more of the following solvents

methanol ethanol, isopropyl alcohol, n-propanol, n-butanol, dichloromethane (DCM), acetonitrile (AcN), tetrahydrofuran (THF), dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide (DMAc), and N-methylpyrrolidone (NMP)

In another embodiment of the process depicted in Scheme 4, in conjunction with any of the above or below embodiments, TBME may be substituted with a solvent

comprising one or more of the following solvents diethyl ether, methyl isopropylether, and diisopropyl ether

In another embodiment of the process depicted in Scheme 4, in conjunction with any of the above or below
5 embodiments, reaction 1) as depicted in Scheme 4 may be conducted at a temperature of about 20°C to about 60°C Preferably, reaction 1) as depicted in Scheme 4 can be conducted at a temperature of about 30°C to about 50°C More preferably, reaction 1) as depicted in Scheme 4 can
10 be conducted at a temperature of about 35°C to about 45°C Most preferably, reaction 1) as depicted in Scheme 4 can be conducted at room temperature

In another embodiment of the process depicted in Scheme 4, in conjunction with any of the above or below
15 embodiments, reaction 2) as depicted in Scheme 4 may be conducted at a temperature of about 20°C to about 60°C Preferably, reaction 2) as depicted in Scheme 4 can be conducted at a temperature of about 30°C to about 50°C More preferably, reaction 1) as depicted in Scheme 4 can
20 be conducted at a temperature of about 35°C to about 45°C Most preferably, reaction 2) as depicted in Scheme 4 can be conducted at room temperature

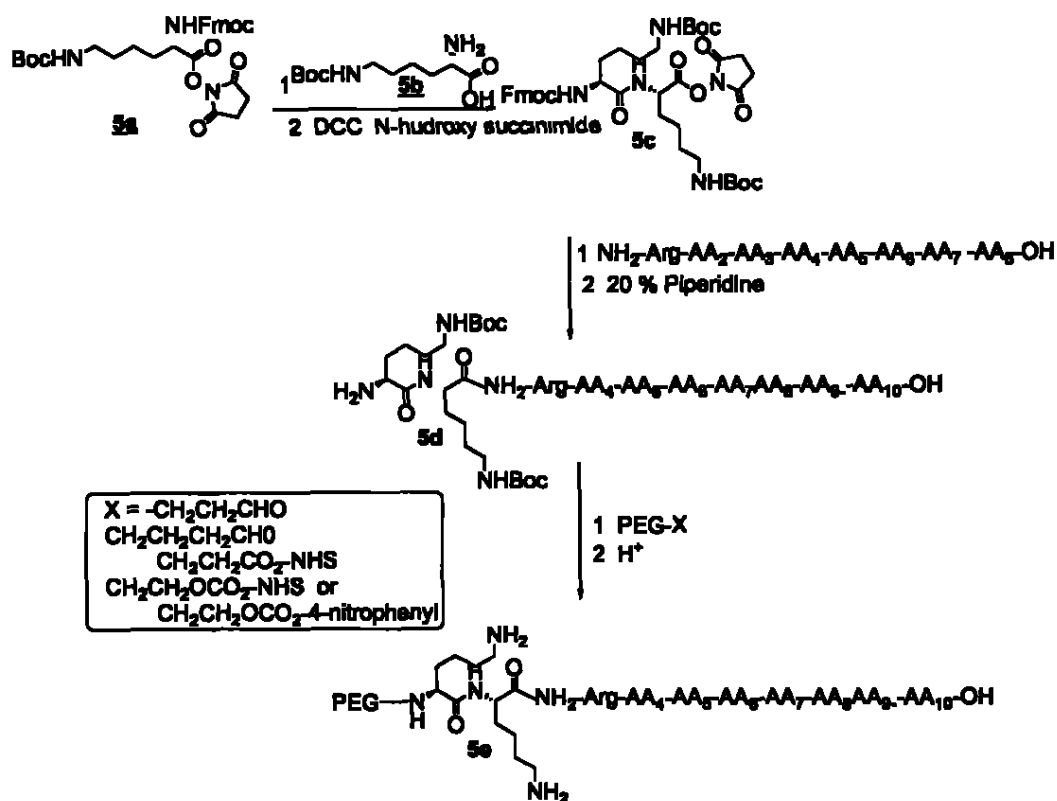
In another embodiment of the process depicted in Scheme 4, in conjunction with any of the above or below
25 embodiments, the precipitation reaction as depicted in Scheme 4 may be conducted for at least 10 minutes More preferably, the precipitation reaction as depicted in Scheme 4 may be conducted for at least 60 minutes Most preferably, the precipitation reaction as depicted in
30 Scheme 4 is conducted for about 60 minutes

In another embodiment of the process depicted in Scheme 4, in conjunction with any of the above or below embodiments, the precipitation, filtration, and/or purification reaction may be conducted more than once

5 In another embodiment of the process depicted in Scheme 4, in conjunction with any of the above or below embodiments, the precipitation and/or purification reactions may be conducted more than once

Partially protected peptides are especially useful
10 reagents for this strategy as they enable selective modification of specific sites of polyfunctional peptides. The protecting groups are removed from the PEG conjugates using established deprotection methods well known by those skilled in the art of peptide synthesis. Partially
15 protected peptides suitable for this application may be prepared using orthogonal protecting strategies well known to persons skilled in the art of peptide synthesis. An illustration of the synthesis of and conjugation of a partially protected peptide antagonist of the bradykinin
20 B1 receptor is depicted in Scheme 5. Analogs in which side chain amines serve as sites of conjugation may be prepared from readily available orthogonally protected basic amino acids.

Scheme 5



5

Partially protected forms of B1 antagonist peptides such as those listed in Table 3 (SEQ ID NOS 5-60) may be conjugated to PEG moieties using similar methods

10 In one embodiment of the process depicted in Scheme 5, amine side chains of the partially protected peptides 5c are masked by tert-butylcarbonyl (Boc) moieties and the resulting peptides are reacted with any of the previously described PEG aldehydes in an organic solvents
 15 such as 1,2-dichloroethane(DCE), N,N-dimethyl formamide(DMF) or mixtures thereof The formation of the

intermediate imine may be accelerated by the addition of a dehydrating agent such as powdered 4°A molecular sieves. After stirring at room temperature for 1-24 hours, the resulting imine is reduced by the addition of 1-4 equivalents of sodium triacetoxy borohydride or sodium cyanoborohydride.

In another embodiment of the process depicted in Scheme 5, in conjunction with any of the above or below embodiments, reactions with partially protected peptides such as 5c may be conducted at a temperature of about 20°C to about 60°C. Preferably, reactions with partially protected peptides such as 5c as depicted in Scheme 5 can be conducted at a temperature of about 20°C to about 50°C. More preferably, reactions with partially protected peptides such as 5c as depicted in Scheme 5 can be conducted at a temperature of about 35°C to about 45°C. Most reactions with partially protected peptides such as 5c as depicted in Scheme 5 can be conducted at room temperature.

In another embodiment of the process depicted in Scheme 5, amine side chains of the partially protected peptides 5c are masked by tert-butylcarbamoyl (Boc) moieties and the resulting peptides are reacted with any of the previously described PEG N-hydroxysuccinimide or p-nitrophenyl ester PEG reagents in an organic solvents such as 1,2-dichloroethane (DCE), N,N-dimethylformamide (DMF), dichloromethane, N-methylpyrrolidine (NMP) or mixtures thereof. Activated PEG esters may be either monofunctional or linear bifunctional varieties both of which are commercially available from suppliers such as Nektar or NOF. In addition, branched polyfunctional PEG

activated ester, containing 3-6 hydroxysuccinimide or p-nitrophenylester moieties are especially useful in preparing conjugates of the present invention

In another embodiment of the process depicted in Scheme 5, in conjunction with any of the above or below embodiments, reactions with partially protected peptides such as 5c may be conducted at a temperature of about 20°C to about 60°C with reaction times ranging from about 4 hours to about 10 days. Preferably, reactions with partially protected peptides such as 5c as depicted in Scheme 5 can be conducted at a temperature of about 20°C to about 50°C with reaction times ranging from about 12 hours to about 5 days. More preferably, reactions with partially protected peptides such as 5c as depicted in Scheme 5 can be conducted at a temperature of about 35°C to about 45°C with reaction times ranging from about 1 to about 5 days. Most reactions with partially protected peptides such as 5c as depicted in Scheme 5 can be conducted at room temperature with reaction times ranging from about 1 to about 4 days.

In another embodiment of the process depicted in Scheme 5, in conjunction with any of the above or below embodiments, the removal of the side chain protecting groups as depicted in Scheme 5 may be conducted at a temperature of about -20°C to about 60°C. This reaction may be performed in a compatible solvent such as dichloromethane using between about 5% trifluoroacetic acid (TFA) and 50% TFA by volume. Preferably, the acid mediated protecting group removal as depicted in Scheme 5 can be conducted at a temperature of about 0°C to about

40°C, using about 10 to about 25% TFA by volume. More preferably, the acid mediated protecting group removal as depicted in Scheme 5 can be conducted at a temperature of about 0°C to about 25°C using about 10% to about 20 % TFA by volume in dichloromethane. Most preferably, the acid mediated protecting group removal as depicted in Scheme 5 can be conducted at room temperature using about 20 % by volume in dichloromethane.

In another embodiment of the process depicted in Scheme 5, in conjunction with any of the above or below embodiments, the products 5d depicted in Scheme 4 may be purified reverse phase HPLC, size exclusion chromatography, ion exchange chromatography or membrane dialysis. More preferably, a combination of two or more of the above mentioned purification techniques may be used either in combination or sequentially to afford purified conjugates of the present invention.

In another embodiment of the process depicted in Scheme 5, in conjunction with any of the above or below embodiments, the purification method may be conducted more than once.

Derivatives Also contemplated herein are derivatives of the peptides and/or conjugated peptides of the present invention. Such derivatives may further improve the solubility, absorption, biological half-life, and the like, of the vehicle- or PEG-conjugated peptides disclosed herein. The added moieties may alternatively eliminate or attenuate any undesirable characteristic of the peptides and/or conjugated peptides disclosed herein. Exemplary

derivatives include vehicle- or PEG-conjugated peptides in which

1 The peptides and/or conjugated peptide or some
5 portion thereof is cyclic For example, the peptide
portion of a peptide and/or conjugated peptide may be
modified to contain two or more cysteine residues (e g ,
in the peptidyl linker), which could cyclize by disulfide
bond formation For citations to references on the
10 preparation of cyclized derivatives, see WO 00/24782

2 The peptide and/or vehicle- or PEG-conjugated
peptide is cross-linked or is rendered capable of cross-
linking between molecules For example, the peptide
15 portion of a conjugated peptide may be modified to contain
one Cys residue and thereby is able to form an
intermolecular disulfide bond with a like molecule

3 One or more peptidyl [-C(O)NR-] linkages (peptide
20 bonds) is replaced by a non-peptidyl linkage Exemplary
non-peptidyl linkages are -CH₂-carbamate
[-CH₂-OC(O)NR-], phosphonate, -CH₂-sulfonamide [-CH₂-
S(O)₂NR-], urea [-NHC(O)NH-], -CH₂-secondary amine, and
alkylated peptide [-C(O)NR⁶- wherein R⁶ is lower alkyl]

25

4 The N-terminal cysteine residue of a a conjugated
peptide in X¹ may be substituted with a N-terminal
derivative group Exemplary N-terminal derivative groups
include -NHR¹ where R¹ is monoalkyl

30

Derivatization with bifunctional agents is useful for cross-linking the vehicle-conjugated peptides or their functional derivatives to a water-insoluble support matrix or to other macromolecular vehicles. Commonly used cross-linking agents include, e g , 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), and bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane. Derivatizing agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]-propioimide yield photo-activatable intermediates that are capable of forming crosslinks in the presence of light. Alternatively, reactive water-insoluble matrices such as cyanogen bromide-activated carbohydrates and the reactive substrates described in U S Patent Nos 3,969,287, 3,691,016, 4,195,128, 4,247,642, 4,229,537, and 4,330,440 are employed for protein immobilization.

Carbohydrate (oligosaccharide) groups may conveniently be attached to sites that are known to be glycosylation sites in proteins. Generally, O-linked oligosaccharides are attached to serine (Ser) or threonine (Thr) residues, while N-linked oligo-saccharides are attached to asparagine (Asn) residues when they are part of the sequence Asn-Aaa-Ser/Thr, where Aaa can be any amino acid except proline. Aaa is preferably one of the nineteen naturally occurring amino acids other than proline. The structures of N-linked and O-linked oligosaccharides and the sugar residues found in each type are different. One type of sugar that is commonly found on both is N-acetylneuraminic acid (referred to as sialic

acid) Sialic acid is usually the terminal residue of both N-linked and O-linked oligosaccharides and, by virtue of its negative charge, may confer acidic properties to the glycosylated conjugated peptide. Such site(s) may be
5 incorporated in the linker of the vehicle-conjugated peptides of the invention. Such sites may further be glycosylated by synthetic or semi-synthetic procedures known in the art.

Other possible modifications include hydroxylation of
10 proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, oxidation of the sulfur atom in cysteine, methylation of the alpha-amino groups of lysine, arginine, and/or histidine side chains (Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties, W. H. Freeman
15 & Co., San Francisco, pages 79-86 (1983)).

Unless otherwise disclosed herein, the synthesis of peptides and/or conjugated peptides described herein, including preparation of appropriate amino acid derivatives, their activation and coupling to form
20 peptides and methods for purification of peptides and determination of their purity are included in the general body of knowledge of peptide chemistry, as generally described in Houben-Weyl "Methoden der Organischen Chemie" Vol. 16, parts I & II, (1974) for solution phase
25 synthesis. For synthesis by the solid phase method, suitable techniques are also well known in the art, and include those described in Merrifield, Chem. Polypeptides, pages 335-361 (Katsoyannis and Panayotis editors) (1973), Merrifield, J. Am. Chem. Soc., Volume 85, page 2149
30 (1963), Davis et al., Biochem. Intl., Volume 10, pages 394-414 (1985), Stewart and Young, Solid Phase Peptide

Synthesis (1969), U S Patent No 3,941,763, Finn et al ,
The Proteins (3d edition), Volume 2, pages 105-253 (1976),
and Erickson et al , The Proteins (Third Edition), Volume
2, pages 257-527 (1976) A chemist skilled in the art of
5 peptide synthesis would be able to synthesize the
described peptides by standard solution methods or by
manual or automatic solid phase methods Solid phase
synthesis is the preferred technique for making individual
peptides because of its cost-effectiveness

10

Pharmaceutical Compositions

In General The present invention also provides methods
of using pharmaceutical compositions of the inventive peptides
15 and/or vehicle-conjugated peptides, e g , in the prevention or
treatment of inflammation and pain (including, but not limited
to, inflammatory pain and associated hyperalgesia and
allodynia) The peptides and/or vehicle-conjugated peptides
of the invention also have therapeutic value for the
20 prevention or treatment of other painful conditions associated
with or mediated by B1 activation, including, but not limited
to, thalamic pain syndrome, diabetes, toxins and chemotherapy,
septic shock, arthritis, mixed-vascular and non-vascular
syndromes, general inflammation, arthritis, rheumatic
25 diseases, lupus, osteoarthritis, inflammatory bowel disorders,
inflammatory eye disorders, inflammatory or unstable bladder
disorders, psoriasis, skin complaints with inflammatory
components, sunburn, carditis, inflammatory bowel disease,
dermatitis, myositis, neuritis, collagen vascular diseases,
30 chronic inflammatory conditions, epithelial tissue damage or
dysfunction, herpes simplex, diabetic neuropathy pain, post-

70

herpetic neuralgia, causalgia, sympathetically maintained pain, , deafferentation syndromes, tension headache, angina, migraine, surgical pain, disturbances of visceral motility at respiratory, genitourinary gastrointestinal or vascular regions, wounds, burns, allergic rhinitis, asthma, allergic skin reactions, pruritis, vitiligo, general gastrointestinal disorders, colitis, gastric ulceration, duodenal ulcers, or vasomotor or allergic rhinitis

The invention also provides for the use of the peptides and/or vehicle-conjugated peptides of the present invention for the prevention or treatment of acute pain, dental pain, back pain, lower back pain, pain from trauma, surgical pain, pain resulting from amputation or abscess, causalgia, demyelinating diseases, trigeminal neuralgia, cancer, chronic alcoholism, stroke, thalamic pain syndrome, diabetes, acquired immune deficiency syndrome ("AIDS"), toxins and chemotherapy, general headache, migraine, cluster headache, mixed-vascular and non-vascular syndromes, tension headache, general inflammation, arthritis, rheumatic diseases, lupus, osteoarthritis, inflammatory bowel disorders, inflammatory eye disorders, inflammatory or unstable bladder disorders, psoriasis, skin complaints with inflammatory components, sunburn, carditis, dermatitis, myositis, neuritis, collagen vascular diseases, chronic inflammatory conditions, inflammatory pain and associated hyperalgesia and allodynia, neuropathic pain and associated hyperalgesia and allodynia, diabetic neuropathy pain, causalgia, sympathetically maintained pain, deafferentation syndromes, asthma, allergic rhinitis, epithelial tissue damage or dysfunction, herpes simplex,

71

post-herpetic neuralgia, disturbances of visceral motility
at respiratory, genitourinary, gastrointestinal or
vascular regions, wounds, burns, allergic skin reactions,
pruritis, vitiligo, general gastrointestinal disorders,
5 colitis, gastric ulceration, duodenal ulcers, and
bronchial disorders

Accordingly, the present invention also relates to the
use of one or more of the peptides and/or vehicle-conjugated
peptides of the present invention in the manufacture of a
10 medicament for the treatment of a disorder such as acute pain,
dental pain, back pain, lower back pain, pain from trauma,
surgical pain, pain resulting from amputation or abscess,
causalgia, demyelinating diseases, trigeminal neuralgia,
cancer, chronic alcoholism, stroke, thalamic pain syndrome,
15 diabetes, acquired immune deficiency syndrome ("AIDS"), toxins
and chemotherapy, general headache, migraine, cluster
headache, mixed-vascular and non-vascular syndromes, tension
headache, general inflammation, arthritis, rheumatic diseases,
lupus, osteoarthritis, inflammatory bowel disorders,
20 inflammatory eye disorders, inflammatory or unstable bladder
disorders, psoriasis, skin complaints with inflammatory
components, sunburn, carditis, dermatitis, myositis, neuritis,
collagen vascular diseases, chronic inflammatory conditions,
inflammatory pain and associated hyperalgesia and allodynia,
25 neuropathic pain and associated hyperalgesia and allodynia,
diabetic neuropathy pain, causalgia, sympathetically
maintained pain, deafferentation syndromes, asthma, allergic
rhinitis, epithelial tissue damage or dysfunction, herpes
simplex, post-herpetic neuralgia, disturbances of visceral
30 motility at respiratory, genitourinary, gastrointestinal or
vascular regions, wounds, burns, allergic skin reactions,

pruritis, vitiligo, general gastrointestinal disorders, colitis, gastric ulceration, duodenal ulcers, and bronchial disorders

As used herein, "treatment" or "treating" is an approach
5 for obtaining beneficial or desired clinical results For purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, one or more of the following improvement or alleviation of any aspect of pain and/or inflammation, including acute, chronic, inflammatory,
10 neuropathic, or post-surgical pain For purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, one or more of the following including lessening severity, alleviation of one or more symptoms associated with pain and/or inflammation including any aspect
15 of pain and/or inflammation (such as shortening duration of pain and/or inflammation, and/or reduction of pain sensitivity or sensation)

Such pharmaceutical compositions or medicaments may be for administration by injection, or for oral, pulmonary,
20 nasal, transdermal or other forms of administration In general, the invention encompasses pharmaceutical compositions comprising effective amounts of at least one peptide and/or at least one vehicle-conjugated peptide of the invention (in amounts effective to prevent, ameliorate, or abolish pain or
25 any of the other medical conditions provided herein) together with pharmaceutically acceptable diluents, excipients, preservatives, solubilizers, emulsifiers, adjuvants and/or carriers Such compositions include diluents of various buffer content (e g , Tris-HCl, acetate, phosphate), pH and
30 ionic strength, additives such as detergents and solubilizing agents (e g , Tween 80, Polysorbate 80), anti-oxidants (e g ,

ascorbic acid, sodium metabisulfite), preservatives (e g ,
Thimerosal, benzyl alcohol) and bulking substances (e g ,
lactose, mannitol), incorporation of the material into
particulate preparations of polymeric vehicle-conjugated
5 peptides such as polylactic acid, polyglycolic acid, etc or
into liposomes Hyaluronic acid may also be used, and this
may have the effect of promoting sustained duration in the
circulation Such compositions may further influence the
physical state, stability, rate of in vivo release, and rate
10 of in vivo clearance of the vehicle-conjugated peptides of the
present invention See, for example, Remington's
Pharmaceutical Sciences, 18th Edition , Mack Publishing Co ,
Easton, PA, pages 1435-1712 (1990), which is herein
incorporated by reference The compositions may be prepared
15 in liquid form, or as a dried powder (such as lyophilized
form) Implantable sustained release formulations are also
contemplated, as are transdermal formulations

Oral dosage forms Contemplated for use herein are
20 oral solid dosage forms, which are described generally in
Chapter 89 of Remington's Pharmaceutical Sciences, above,
which is herein incorporated by reference Solid dosage
forms include tablets, capsules, pills, troches or
lozenges, cachets or pellets Also, liposomal or
25 proteinoid encapsulation may be used to formulate the
present compositions (such as, for example, the proteinoid
microspheres reported in U S Patent No 4,925,673)
Liposomal encapsulation may be used, and the liposomes may
be derivatized with various polymers (see, for example,
30 U S Patent No 5,013,556) A description of possible
solid dosage forms is given in Chapter 10 of Marshall, K ,

Modern Pharmaceuticals, edited by G S Banker and C T Rhodes (1979), herein incorporated by reference In general, the formulation will include a vehicle-conjugated peptide of the invention, as well as inert ingredients
5 which allow for protection against the stomach environment and release of the vehicle-conjugated peptide in the intestine

Also specifically contemplated are oral dosage forms of the inventive peptides and/or vehicle-conjugated
10 peptides themselves In this regard, if necessary, the peptides and/or vehicle-conjugated peptides may be chemically modified so that oral delivery is efficacious It is also possible to use a salt of a modified aliphatic amino acid, such as sodium N-(8-[2-hydroxybenzoyl] amino)
15 caprylate (SNAC), as a carrier to enhance absorption of the vehicle-conjugated peptides of the invention See U S Patent No 5,792,451, entitled "Oral Drug Delivery Composition and Methods"

The peptides and/or vehicle-conjugated peptides of
20 the invention can be included in the formulation as fine multi-particulates in the form of granules or pellets of a particle size about one millimeter The formulation of the material for capsule administration could also be as a powder, as lightly compressed plugs, or even as tablets
25 The therapeutic could be prepared by compression

Colorants and flavoring agents may all be included For example, the peptide and/or vehicle-conjugated peptide or any derivative thereof may be formulated (such as by liposome or microsphere encapsulation) and then further
30 contained within an edible product, such as a refrigerated beverage containing colorants and flavoring agents

One may dilute or increase the volume of the peptide and/or vehicle-conjugated peptide of the invention with an inert material. These diluents could include carbohydrates, especially, mannitol, α -lactose, anhydrous lactose, cellulose, sucrose, modified dextrans and starch. Certain inorganic salts may also be used as fillers, including calcium triphosphate, magnesium carbonate and sodium chloride. Some commercially available diluents are Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress and Avicell.

Disintegrants may be included in the formulation of the therapeutic into a solid dosage form. Materials used as disintegrants include, but are not limited to, starch, including the commercially available disintegrant based on starch, Explotab. Sodium starch glycolate, Amberlite, sodium carboxymethylcellulose, ultramylopectin, sodium alginate, gelatin, orange peel, acid carboxymethyl cellulose, natural sponge and bentonite may also be used. Another form of the disintegrants are the insoluble cationic exchange resins. Powdered gums may be used as disintegrants and as binders, and these can include powdered gums such as agar, Karaya or tragacanth. Alginic acid and its sodium salt are also useful as disintegrants.

Binders may be used to hold the components of the pharmaceutical composition together to form a hard tablet, and they include materials from natural products such as acacia, tragacanth, starch and gelatin. Others include methyl cellulose (MC), ethyl cellulose (EC) and carboxymethyl cellulose (CMC). Polyvinyl pyrrolidone (PVP) and hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) could both be used in alcoholic solutions to granulate the therapeutic.

An anti-frictional agent may be included in the formulation to prevent sticking during the formulating process. Lubricants may be used as a layer between the therapeutic and the die wall, and these can include, but
5 are not limited to stearic acid, including its magnesium and calcium salts, polytetrafluoroethylene (PTFE), liquid paraffin, vegetable oils and waxes. Soluble lubricants may also be used such as sodium lauryl sulfate, magnesium lauryl sulfate, polyethylene glycol of various molecular
10 weights, Carbowax 4000 and 6000.

Glidants that might improve the flow properties of the vehicle-conjugated peptide during formulation and to aid rearrangement during compression might be added. Such
15 glidants may include starch, talc, pyrogenic silica and hydrated silicoaluminate.

To aid dissolution of the peptide and/or vehicle-conjugated peptide of the invention into the aqueous environment, a surfactant might be added as a wetting agent. Such surfactants may include anionic detergents
20 such as sodium lauryl sulfate, dioctyl sodium sulfosuccinate and dioctyl sodium sulfonate. Cationic detergents may be used and can include benzalkonium chloride or benzethonium chloride. The list of potential nonionic detergents that may be included in the
25 formulation as surfactants are lauromacrogol 400, polyoxyl 40 stearate, polyoxyethylene hydrogenated castor oil 10, 50 and 60, glycerol monostearate, polysorbate 40, 60, 65 and 80, sucrose fatty acid ester, methyl cellulose and carboxymethyl cellulose. These surfactants may be present
30 in the formulation either alone or as a mixture in different ratios.

Additives may also be included in the formulation to enhance uptake of the peptides and/or vehicle-conjugated peptide. Additives potentially having this property include various fatty acids, such as, for instance, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid.

Controlled release formulation may be desirable. The peptide and/or vehicle-conjugated peptide of the invention may be incorporated into an inert matrix which permits release by either diffusion or leaching mechanisms, for example, gums. Slowly degenerating matrices may also be incorporated into the formulation, for example, alginates or polysaccharides. Another form of a controlled release of the peptide and/or vehicle-conjugated peptide of the invention is by a method based on the Oros therapeutic system (Alza Corp), i.e., the drug is enclosed in a semipermeable membrane which allows water to enter and push drug out through a single small opening due to osmotic effects. Some enteric coatings also have a delayed release effect.

20

Pulmonary delivery forms Also contemplated herein is pulmonary delivery of a pharmaceutical composition in accordance with the invention. The peptide and/or vehicle-conjugated peptide (or derivatives thereof) is delivered to the lungs of a mammal while inhaling and traverses across the lung epithelial lining to the blood stream. Reports relating to the pulmonary delivery of macromolecules that may be helpful in this regard include Adjei et al, Pharma Res, Volume 7, pages 565-569 (1990), Adjei et al, Internatl J Pharmaceutics, Volume 63, pages 135-144 (1990) (leuprolide acetate), Braquet et

30

al , J Cardiovasc Pharmacol , Volume 13 (suppl 5),
 s 143-146 (1989) (endothelin-1), Hubbard et al , Annals
 Int Med , Volume 3, pages 206-12 (1989) (α 1-antitrypsin),
 Smith et al , J Clin Invest , Volume 84, pages 1145-1146
 5 (1989) (α 1-proteinase), Oswein et al , "Aerosolization of
 Proteins", Proc Symp Resp Drug Delivery II, Keystone,
 Colorado (1990) (recombinant human growth hormone), Debs
 et al , J Immunol , Volume 140, pages 3482-3488 (1988)
 (interferon- γ and tumor necrosis factor α), and U S Patent
 10 No 5,284,656 (granulocyte colony stimulating factor)

Contemplated for use in the practice of the invention
 are a wide range of mechanical devices designed for the
 pulmonary delivery of therapeutic products, including but
 not limited to nebulizers, metered dose inhalers, and
 15 powder inhalers, all of which are familiar to those
 skilled in the art Some specific examples of
 commercially available devices suitable for the practice
 of the invention are the Ultravent nebulizer, manufactured
 by Mallinckrodt, Inc , St Louis, Missouri, the Acorn II
 20 nebulizer, manufactured by Marquest Medical Products,
 Englewood, Colorado, the Ventolin metered dose inhaler,
 manufactured by Glaxo Inc , Research Triangle Park, North
 Carolina, and the Spinhaler powder inhaler, manufactured
 by Fisons Corp , Bedford, Massachusetts

25 All such devices require the use of formulations
 suitable for the dispensing of the herein described
 peptides and/or vehicle-conjugated peptides and/or
 derivatives thereof Typically, each formulation is
 specific to the type of device employed and may involve
 30 the use of an appropriate propellant material, in

addition to diluents, excipients adjuvants and/or carriers useful in therapy

Pharmaceutically acceptable carriers for these pulmonary compositions include carbohydrates such as
5 trehalose, mannitol, xylitol, sucrose, lactose, and sorbitol Other ingredients for use in formulations may include DPPC, DOPE, DSPC and DOPC Natural or synthetic surfactants may be used PEG may be used (even apart from its use in derivatizing the peptide) Dextrans,
10 such as cyclodextran, bile salts, cellulose and cellulose derivatives may also be used Amino acids may be used, such as in a buffer formulation

In addition, the use of liposomes, microcapsules or microspheres, inclusion complexes, or other types of
15 carriers is contemplated

Formulations suitable for use with a nebulizer, either jet or ultrasonic type, will typically comprise the described peptide and/or vehicle-conjugated peptide dissolved in water at a concentration of about 0.1 to 25
20 milligrams (mg) of biologically active agent per milliliter (ml) of solution The formulation may also include a buffer and a simple sugar (e.g., for peptide stabilization and regulation of osmotic pressure) The nebulizer formulation may also contain a surfactant, to
25 reduce or prevent surface induced aggregation of the protein caused by atomization of the solution in forming the aerosol

Formulations for use with a metered-dose inhaler device will generally comprise a finely divided powder
30 containing the described peptide and/or vehicle-conjugated peptide suspended in a propellant with the aid of a

surfactant The propellant may be any conventional material employed for this purpose, such as a chlorofluorocarbon, a hydrochlorofluorocarbon, a hydrofluorocarbon, or a hydrocarbon, including
5 trichlorofluoromethane, dichlorodifluoromethane, dichlorotetrafluoroethanol, and 1,1,1,2-tetrafluoroethane, or combinations thereof Suitable surfactants include sorbitan trioleate and soya lecithin Oleic acid may also be useful as a surfactant

10 Formulations for dispensing from a powder inhaler device will comprise a finely divided dry powder containing the described peptides and/or vehicle-conjugated peptides and may also include a bulking agent, such as lactose, sorbitol, sucrose, mannitol, trehalose,
15 or xylitol in amounts which facilitate dispersal of the powder from the device, e g , 50 to 90% by weight of the formulation

Nasal delivery forms Nasal delivery of the peptide
20 and/or vehicle-conjugated peptides is also contemplated Nasal delivery allows the passage of the peptide and/or vehicle-conjugated peptides of the invention to the blood stream directly after administering the therapeutic product to the nose, without the necessity for deposition
25 of the product in the lung Formulations for nasal delivery include those with dextran or cyclodextran Delivery via transport across other mucous membranes is also contemplated

30 Pump delivery In certain embodiments of the present invention, localized delivery of the peptides and/or

conjugated peptides of the present invention is contemplated for treating or preventing B1 mediated disorders. One method of localized delivery contemplated by the invention is injection of the agent at a local site
 5 at which the agent acts

Another method for localized delivery includes inserting a catheter to direct the drug(s) to the desired body site, and using a pump to impel a drug(s) through the catheter. Externally worn drug pumps used with an
 10 internally implanted catheter are well known to those skilled in the art

Yet another method for localized delivery includes implantable drug delivery devices. Implantable pumps have been developed to address the disadvantages of techniques
 15 that use external pump and catheter systems are well-known to those skilled in the art. Implantable drug delivery pumps often include a reservoir for storing the drug, an injection port to enable injection of fresh drug preparations as well removal of old drug at regular
 20 intervals from the reservoir, and optionally a catheter for delivering the drug to the desired site. Preferred implantable devices include, but are not limited to, the Duros implant (Alza Corporation, Mountain View, CA), the SynchroMed I or II Infusion System (Medtronic, Inc ,
 25 Minneapolis) and the like

Additionally (or alternatively), the present invention provides peptides and/or conjugated peptides for use in any of the various slow or sustained release formulations or microparticle formulations previously
 30 mentioned hereinabove and/or known to the skilled artisan

Dosages Effective dosages of the peptides and/or conjugated peptides of the invention to be administered may be determined through procedures well known to those in the art which address such parameters as biological half-life, bioavailability, and toxicity. In preferred embodiments, an effective dosage range is determined by one skilled in the art using data from routine *in vitro* and *in vivo* studies well known to those skilled in the art. For example, *in vitro* cell culture assays, such as the exemplary assays described in Example 6 below will provide data from which one skilled in the art may readily determine the mean inhibitory concentration (IC) or mean effective concentration (EC) of the peptide or the conjugated peptide necessary to block some amount of B1 induced activity (e.g., 50%, IC₅₀, or 90%, IC₉₀). Appropriate doses can then be selected by one skilled in the art using pharmacokinetic data from one or more routine animal models, such as the exemplary pharmacokinetic data described in Example 9, below, so that a minimum plasma concentration (C_{min}) of the peptide is obtained which is equal to or exceeds the determined IC value. The dosage regimen involved in a method for treating the involved disease or disorder will be determined by the attending physician, considering various factors which modify the action of therapeutic agents, such as the age, condition, body weight, sex and diet of the patient, the severity of the condition being treated, time of administration, and other clinical factors. Generally, the daily regimen should be in the range of 1 0-10000 micrograms (μg) of the peptide and/or vehicle-conjugated peptide per kilogram (kg) of body weight, preferably 1 0-1000 μg per kilogram of body weight, and most preferably 1 0-150 μg per kilogram of body weight.

Combination Therapy In another aspect, the present invention includes a method for treating (or, in other embodiments, preventing) pain and/or inflammation, or any condition or disorder associated with B1 activation, comprising administering an amount of peptide and/or conjugated peptide of the present invention and an amount of an NSAID. The term "NSAID" refers to a non-steroidal anti-inflammatory compound. The relative amounts and ratios of peptide antagonist and/or conjugated peptide antagonist and NSAID may vary. In some embodiments, enough of the peptide(s) and/or conjugated peptide(s) will be administered so as to allow reduction of the normal dose of NSAID required to effect the same degree of pain or inflammation amelioration. In some embodiments, enough of a peptide(s) and/or conjugated peptide(s) of the present invention will be administered so as to allow reduction of the normal dose of NSAID required to effect the same degree of pain or inflammation amelioration by at least about 5%, at least about 10%, at least about 20%, at least about 30%, at least about 40%, at least about 50%, at least about 60%, at least about 70%, at least about 80%, or at least about 90%, or more. This reduction may be reflected in terms of amount administered at a given administration and/or amount administered over a given period of time (reduced frequency).

In another aspect, the invention provides methods for enhancing NSAID pain or inflammation treatment comprising administering an effective amount of an NSAID in conjunction with an effective amount of at least one peptide and/or at least one conjugated peptide of the present invention. As used herein, "administration in conjunction" is also meant to encompass any circumstance wherein an NSAID and a peptide

and/or conjugated peptide of the present invention are administered in an effective amount to an individual "Administration in conjunction", as used herein, comprises simultaneous administration and/or administration at different times Administration in conjunction also encompasses administration as a co-formulation (i.e., the peptide and/or conjugated peptide of the present invention and NSAID are present (combined) in the same composition) and/or administration as separate compositions It is understood that the peptide(s) and/or conjugated peptide(s) of the present invention and at least one NSAID can be administered at different dosing frequencies and/or intervals For example, a conjugated peptide of the present invention may be administered weekly, while an NSAID can be administered more frequently It is understood that the peptide(s) and/or conjugated peptide(s) of the present invention and the NSAID can be administered using the same route of administration or different routes of administration, and that different dosing regimens may change over the course of administration(s) Administration may even be before the onset of pain or inflammation Therefore, in another aspect, the invention provides methods for treating, reducing incidence of, palliating and/or delaying the development or progression of pain and/or inflammation in an individual, said methods comprising administering an effective amount of at least one peptide and/or at least one conjugated peptide of the present invention in conjunction with an effective amount of at least one NSAID Such methods include treating or preventing any pain and/or inflammation of any etiology, including pain and/or inflammation where the use of an NSAID is generally prescribed Such methods are also suitable for treating or

preventing any condition or disorder previously mentioned hereinabove or hereinbelow as being mediated by or associated with B1 activation In some embodiments, the pain and/or inflammation is post-surgical pain In some embodiments, the pain and/or inflammation is associated with burns or wounds In other embodiments, the pain and/or inflammation is associated with rheumatoid arthritis In other embodiments, the pain and/or inflammation is associated with osteoarthritis In other embodiments, the pain and/or inflammation is associated with post-herpetic neuralgia In some embodiments, the NSAID is selected from the group consisting of aspirin, acetaminophen, ibuprofen, indomethacin, naproxen, naprosyn, diclofenac, ketoprofen, tolmetin, slindac, mefenamic acid, meclofenamic acid, diflunisal, Rufenisal, piroxim, sudoxicam, isoxicam, celecoxib, rofecoxib, DUP-697, flosulide, meloxicam, 6methoxy-2 naphthylacetic acid, MK-966, nabumetone, nimesulide, NS-398, SC-5766, SC58215, T-614, or combinations thereof

20 EXAMPLES

The following Examples are presented for illustrative purposes only and are not intended, nor should they be construed, as limiting the invention in any manner Those skilled in the art will appreciate that modifications and variations of the compounds disclosed herein can be made without violating the spirit or scope of the present invention Compounds according to the invention can be synthesized according to one or more of the following methods It should be noted that the general procedures are shown as it relates to preparation of compounds having unspecified stereochemistry However, such procedures are

generally applicable to those compounds of a specific stereochemistry, e g , where the stereochemistry about a group is (S) or (R) In addition, the compounds having one stereochemistry (e g , (R)) can often be utilized to
5 produce those having opposite stereochemistry (i e , (S)) using well-known methods, for example, by inversion

Example 1 Synthesis and Purification of B1 receptor Peptide antagonists and PEG-Conjugated B1 Receptor Peptide
10 **Antagonists**

Various peptides of the invention were synthesized using synthesis techniques well-known in the art A preferred method of synthesizing various peptides of the
15 invention uses a Fmoc strategy with carbodiimide activation as described below

Part 1 Dissolve Fmoc-amino acid to resin using carbodiimide chemistry

20 Fmoc-amino acid (3-4 equivalent) was dissolved in dry DCM/NMP mixture (NMP or DMF was used to aid complete dissolution) A solution of N-hydroxybenzotriazole (HOBT, same equivalent to amino acid) in NMP was added to the amino acid solution A solution of N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide (DCC, same equivalent to amino acid) in DCM
25 was added to the amino acid solution The solution was mixed for approximately 20 minutes The activated acid solution was then added to resin (if needed, precipitates were removed prior to addition) The reaction was
30 agitated until the resin was negative by the ninhydrin

test Upon completion of the coupling, the resin was collected and washed with DMF several times

Part 2 Remove N-terminal Fmoc from peptide-resin

Fmoc-protected peptidyl resin was treated with
 5 piperidine/DMF (2/8) for 3 minutes The resin was drained and treatment was repeated for 15 min The resin was washed with DMF and then DCM several times The resin was air-dried if the next step involved cleavage of the peptide from the resin as described in step 3

10 Part 3 TFA cleavage and deprotection

The dried resin from Part 2 was placed in a flask and 10-25 ml/g resin of cleavage cocktail (95%TFA, 2.5%water, 1.5% triisopropylsilane and 1% ethanedithiol) was added After stirring the reaction for 3-4 hours, the resin was
 15 removed by filtration under reduced pressure and washed twice with TFA The combined filtrates were concentrated to ~20% by rotary evaporation under reduced pressure The liquid was cooled to -50 °C, and precipitated with 10-fold volume of cold dry ether The precipitate was collected
 20 The peptide was then dissolved in a water/acetonitrile mixture containing 0.5% TFA and lyophilize The crude product was then purified using C18 HPLC, on a gradient from 10% acetonitrile/0.1% TFA in water to 50% acetonitrile/0.1% TFA in water For 1 g of crude product,
 25 a 250x50 mm C18 column was used at a flow rate of 90 mL/min on an Agilent prep HPLC with dual wavelength detection at 215 and 254 nm The injection was fractionated and each fraction analyzed by mass spectrometry Tubes were pooled based on mass spec,
 30 concentrated under reduced pressure to remove acetonitrile, and lyophilized to obtain the peptide B1

antagonists as white powders Characterization was accomplished by HPLC-MS and Maldi-TOF mass determination

Various PEG-conjugated peptides of the invention were
5 prepared as follows

Various active bradykinin B1 receptor peptide antagonists selected from the group consisting of SEQ ID NOS 5-60) were synthesized with different peptidyl linkers at the N-terminus, and each containing a penultimate
10 cysteine using the aforementioned methods (e g , SEQ ID NOS 27-41) These peptide analogs were derivatized with different sizes and configurations of poly(ethylene glycol) (PEG) through site-directed coupling of the maleimide activated polymer to the N-terminal cysteine
15 thiol of the peptide analogs using, for example, Method A or Method B described below The resultant PEG-peptide conjugates were purified by ion exchange chromatography, concentrated by lyophilization or diafiltration and dialyzed into buffer prior to *in vitro* and *in vivo*
20 bioassay

Method A

PEG-conjugated peptides were prepared by reacting a cysteine containing peptide with PEG-maleimide in 50 mM
25 NaHPO₄, 5 mM EDTA, pH 6.5 at 2.5 - 5 mg/ml peptide and a reaction stoichiometry of 1.2-fold molar excess of maleimide thiol The reaction was stirred at room temperature (20-25 °C) for 1-1.5 hr Once complete, the reaction was quenched with a 10-fold molar excess of β-
30 mercaptoethanol (β-ME) maleimide and allowed to stir an additional 30-60 minutes at room temperature

Progress of the reaction was monitored using reverse-phase HPLC (RP-HPLC) by injection of 5 μ l of the reaction to a 4.6 x 250 mm, 5 micron C4 column (Grace Vydac, Columbia, MD, cat no #214TP54). The unreacted peptide and PEG-peptide conjugate are eluted with a linear 5-90% acetonitrile gradient in 0.1% trifluoroacetic acid. Typically, >90% of the peptide analog is consumed in the reaction.

Linear maleimide activated PEG polymers (MW= 5kD or 20kD, PD=1.01-1.02) were provided by Shearwater Corp or NOF Corp, (Toyko, Japan).

Purification

The PEG-conjugated peptides were purified by cation exchange chromatography using SP Sepharose HP columns (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with 10 mM NaOAc, 20% EtOH, pH 4. Prior to loading, the reaction mixtures were diluted 10-fold with 20% EtOH and the pH adjusted to 3.5 with glacial acetic acid. The diluted reaction mixtures were loaded to an appropriate sized column such that a peptide resin ratio of 2.5 mg/ml was not exceeded.

The column was then washed with 2 column volumes (CVs) of 10 mM NaOAc, 20% EtOH, pH 4 and eluted with a linear 0-200 mM NaCl gradient in 10mM NaOAc, 20% EtOH, pH 4 over 10-20 CV. The unmodified peptide and PEG-peptide conjugate were detected by monitoring absorbance at either 254 nm or 220 nm. Under these conditions, the excess PEG and β -ME were washed out in the unbound flow-through fraction, the conjugate eluted in a broad peak starting ~50 mM NaCl and the free peptide was well resolved, eluting at ~200 mM NaCl.

The eluted peak fractions were evaluated by RP-HPLC and pooled based on homogeneity and retention times consistent with PEG-peptide conjugate. The pooled conjugate peak was concentrated by drying, then
5 reconstituted in water and dialyzed against buffer. Alternatively diafiltration may be used to concentrate and buffer exchange the conjugate.

The final pools of PEG-peptide conjugates were analyzed by RP-HPLC and were typically ~98% conjugate.
10 Conjugate composition and concentrations were determined by a combination of amino acid analyses, peptide sequencing, and absorbance spectroscopy.

The solution stability of compounds represented by 1c in Scheme 1 was monitored at ambient temperature in
15 pH=7.2 phosphate buffered saline (PBS) over time using the CEX method described above (Figure 1(A)). Compound 1c was shown to rapidly convert to 1d as well as to two products resulting from hydrolysis of the succinimide moiety (structures determined by a combination of IR, MS/MS and
20 NMR experiments).

Method B

mPEG-maleimide (1.0 eq) was dissolved at 30°C in anhydrous MeOH in a 3-necked round bottom flask equipped
25 with a mechanical stirrer, temperature probe, and a N₂ inlet. Upon total dissolution of mPEG-maleimide, a peptide containing a N-terminal cysteine residue (1.3 eq) was added into the clear solution and stirred at rt for 3h. Reverse phase HPLC shows disappearance of mPEG-maleimide
30 and new peak for the initial 3-sulfanyl-succinimide adduct. Next, ten equivalents of diisopropyl-ethylamine (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) was added into the solution.

and stirred at 25°C for at least 24 hours. The reaction was monitored by ion exchange chromatography using TOSHAAS SP-5PW (20 µm) as stationary phase. CEX analysis indicated over 98% conversion with less than 1.5% of the 3-sulfanyl-succinimide adduct remaining. Tertiary butyl methyl ether (TBME) was added (twice the volume methanol used in the reaction) and the resulting cloudy solution was stirred at room temperature for 1 hour. The white precipitate was filtered off and dried under vacuum at room temperature overnight to afford the crude 6-methyl-carbamoyl-5-oxo-thiomorpholine-3-carboxamide linked product (1d).

Purification

The above crude product was purified by RP-HPLC using MeOH-H₂O-AcOH system (C18 YMC ODS NQ as stationary phase) to afford the 6-methyl-carbamoyl-5-oxo-thiomorpholine-3-carboxamide linked product with a purity > 98% by analytical reverse phase chromatography. The pure fractions were combined and concentrated to dryness under vacuum and the resulting white residue was dissolved in the minimum amount of warm MeOH (~30°C) sufficient to give a clear solution then treated with TBME (twice the volume of MeOH used). The resulting cloudy solution was stirred at room temperature for 1 hour and precipitate was filtered off, dried under vacuum at room temperature for at least 16 hours. Pure product (1d) is obtained as an off-white in 74% overall yield with >98% CEX and RPC purity. Conjugate composition and peptide content were determined by a combination of amino acid analyses, peptide sequencing, multinuclear NMR methods and absorbance spectroscopy. The solution stability of compound 1d was monitored at ambient temperature in pH 7 phosphate buffered saline (PBS) was monitored over time using the

CEX method described above This compound proved significantly more stabile, with no significant changes noted over six days

5 Analytical reverse phase (RP) and cation exchange (CEX) chromatography was performed on Agilent 1100 HPLC systems with diode array or variable wavelength detector and thermostatted autosampler Standard chromatographic conditions are outlined below

10	1 RP-HPLC Method Conditions		Column		YMC ODS-AQ, 3µm, 120
	Å 4.6 x 100 mm				
	Column Temp	40°C			
	Mobile Phases	A) 0.1%TFA in water			
		B) 0.1%TFA in MeOH			
15	Flow rate	1.1 mL/min			
	Gradient	Time	%B		
		0	5		
		10	40		
		30	95		
20		35	95		
		35.1	5		
		40	5		
	Detection	UV at 220 nm			
	Injection volume	20 µL or 50 µL depending on the sample concentration			
25	Sample concentration	2.5 to 10 mg/mL			
	Sample diluent	Dulbecco's PBS and other buffers used in the stability			
	studies				

2 General Analytical Cation Exchange Chromatographic Method

30	Column	TOSOH TSK-GEL, SP-5PW, 10µm 7.5 x 75 mm		
	Column Temp	25°C		
	Mobile Phases	A) 20 mM NaH ₂ PO ₄ in water/EtOH (8:2), pH 3.5		
		B) 20 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.5 M NaCl in water/EtOH (8:2), pH 3.5		
35	Flow rate	1.0 mL/min		
	Gradient	Time	B%	

	0	0
	3	0
	25	45
	40	100
5	45	100
	45 1	0
	50	0
	Detection	UV at 220 nm
	Injection volume	10 to 50 μ L depending on the sample concentration
10	Sample concentration	2.5 to 10 mg/mL

Sample diluent Dulbecco's PBS and other buffers used in the stability studies

Example 2: Synthesis and Purification of PEG-Conjugated B1 Receptor Peptide Antagonists using PEG Thioesters

PEG-conjugated peptides were prepared by reacting a cysteine containing peptide with PEG-maleimide in 50 mM NaHPO₄, 5 mM EDTA, pH 7 at 2.5 - 5 mg/ml peptide and a reaction stoichiometry of 1.2-fold molar excess of maleimide thiol. The reaction was stirred at room temperature (20-25°C) for 18-26 hours. Once complete, the reaction is quenched with a 10-fold molar excess of β -mercaptoethanol (β -ME) maleimide and allowed to stir an additional 30-60 minutes at room temperature. The reactions were purified as described for Method A in Example 1 above.

Example 3 Synthesis and Purification of PEG-Conjugated B1 Receptor Peptide Antagonists using PEG Thioesters or Iodoacetates

PEG-conjugated peptides were prepared by reacting peptide containing a N-terminal cysteine residue with PEG-OPTE (ortho-pyridyl thio ester) in 50 mM NaHPO₄, 5 mM EDTA, pH 7 at 2.5 - 5 mg/ml peptide and a reaction stoichiometry of 1.2-fold molar excess of activated PEG peptide. The reaction was stirred at room temperature (20-25°C) for 18-26 hr. Once complete, the reaction is quenched with a 10-fold molar excess of cysteine excess PEG reagent and allowed to stir an additional 30-60 minutes at room temperature. The reactions were purified as described in Method A of Example 1 above.

Alternatively, PEG-iodoacetamide may be used as described above to form conjugates in which the PEG moiety is attached via a thioether linkage (Scheme 3). In this case 1.5 molar equivalents of the activated PEG reaction is used and the reaction time is increased to 24 hours. The reaction is quenched w/ 10 molar equivalents of β-mercaptoethanol purified as described in the examples above.

20

Example 4 Synthesis and Purification of PEG-Conjugated B1 Receptor Peptide Antagonists using PEG propionaldehyde

B1 receptor peptide antagonists such as any one of SEQ ID NOS 5-60 and 27-41 can be selectively N-terminally modified with PEG using the method described in US patent 5,824,784 (which is hereby incorporated by reference in its entirety). For example, the peptide as shown in SEQ ID NO 6 (245 mg, 0.14 mmol) was dissolved in 10 mL of solution containing 100 mM NaH₂PO₄ and 60 mM NaCNBH₃. The mixture was cooled to 4°C with over stirring and treated

30

with 2.35 g of 20K mPEG propionaldehyde (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL). The mixture was stirred for 3 days, then purified by RP and CEX chromatography as described in Method B of Example 1.

5 Alternatively, PEGs containing amine reactive functionalities may be reacted with partially protected B1 peptide antagonists according to the methods illustrated in Scheme 5. Following the conjugation reaction, the side chain protecting groups are cleaved using methods well
10 known by those skilled in the art of solid and solution phase peptide synthesis, and the resulting PEG-peptide constructs purified as described above. Multifunctional PEG aldehydes (3-6 reactive groups) may also be reacted with excess molar amounts of protected peptides to afford
15 multivalent PEG constructs in which multiple peptides are attached in a regiochemically and stoichiometrically defined manner.

**Example 5 Synthesis and Purification of PEG-Conjugated
20 B1 Receptor Peptide Antagonists using PEG N-hydroxy-succinimides**

B1 receptor peptide antagonists such as any one of SEQ ID NOS 5-60 may be selectively pegylated on a specific
25 N-terminal or side chain nitrogen atom using partially protected B1 peptide antagonists according to the methods illustrated in Scheme 5. For example, a solution of partially decapeptide (1.43 g, 1.025 mmol) in 2.5 mL of anhydrous DMF was combined with 3.5 g (0.18
30 mmol) of Sunbright PTE-200GS (20 kD 4-arm succinimidylglutamate, NOF, Tokyo, Japan) and 1.0 mL of

diisopropylethyl amine in 25 mL of dichloromethane The
resulting colorless solution was stirred at room
temperature for 2 days then evaporated at reduced
pressure The resulting residue was dissolved in 25 mL of
5 deionized water and placed in a 10,000 MW cutoff dialysis
membrane (Pierce, Rockford IL, USA) The compound was
dialyzed against water for 24 hours (3 buffer changes),
then lyophilized to afford the protected tetravalent PEG
product The resulting white solid was dissolved in 60 mL
10 dichloromethane and treated with 20 mL of anhydrous TFA
After stirring at roomtemperature for 2 days the reaction
mixture was evaporated at reduced pressure then dissolved
in dialyzed as above The dialyzed material was
lyophilized then purified by ion exchange chromatography
15 as previously described to afford the tetravalent product
as a white solid In a similar fashion PEGs containing
1-6 succinimidylglutamate moieties may be used to prepare
mono or polyfunctional peptide constructs

Table 4a X¹ Peptides

SEQ ID NO:	Sequence of X ¹ Peptide
27	{N} CGGGKRPPGFSPL {C}
28	{N} CGGGGGKRPPGFSPL {C}
29	{N} CGGGGGKKRPPGFSPL {C}
30	{N} CGGGGGKKRPPGFSPL {C}
31	{N} CG-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -KRPPGFSPL {C}
32	{N} CGGGGGKKRPPG[AMeF]S[D-β-Nal]I {C}
33	{N}CGGGGGKKRP[Hyp]G[Cpg]S[DTic][Cpg]{C}
34	{N}CGGGGGGGKKRP[Hyp]G[Cpg]S[DTic][Cpg]{C}
35	{N} ac-CGGGGGGKKRP[Hyp]G[Cpg]S[DTic][Cpg]{C}
36	{N}KKRP[Hyp]G[Cpg]S[DTic][Cpg]{C}
37	{N}acyl-KKRP[Hyp]G[Cpg]S[DTic][Cpg]{C}
38	{N} CKRPPGFSPL {C}
39	{N}CGGGGG[Dorn]KRP[Hyp]G[Cpg]S[DTic][Cpg]{C}
40	{N}CGGGGG[Dorn]KRP[Thz]G[Cpg]S[DTic][Cpg]{C}
41	{N}CGGGGGK[Dorn]RP[Hyp]G[Cpg]S[DTic][Cpg]{C}

Table 4b: Y¹ Peptide

SEQ ID NO:	Sequence of Y ¹ Peptide
42	{N} GGGGGKKRPPGFSPL {C}

Example 6 In vitro B1-Inhibition Activity of Peptide PEG-conjugated peptide antagonists of B1 activity

5

Peptides and/or conjugated peptides capable of selectively inhibiting B1 activity as compared to B2 activity were identified using assays such as those described in Sections A, B, and C below

10

A In vitro Assay of human B1 Receptor Function
using Calcium Flux

Activation of the G_q linked B1 receptor results in an increase in intracellular calcium. The calcium sensitive photoprotein aequorin can, therefore, be used as an indicator of B1 receptor activation. Aequorin is a 21-kDa photoprotein that forms a bioluminescent complex when linked to the chromophore cofactor coelenterazine. Following the binding of calcium to this complex, an oxidation reaction of coelenterazine results in the production of apoaequorin, coelenteramide, CO₂, and light that can be detected by conventional luminometry.

A stable CHO D-/human B1 receptor (GenBank Accession no. AJ238044)/Aequorin cell line was established and the cells were maintained in suspension in spinner bottles containing a 1:1 ratio of DMEM and HAM F12 (Gibco 11765-047), high glucose (Gibco 11965-084), 10% Heat Inactivated Dialyzed serum (Gibco 26300-061), 1X Non-Essential Amino Acids (Gibco 11140-050), 1X Glutamine-Pen-Strep (Gibco 10378-016), and Hygromycin, 300 µg/ml (Roche 843555). Fifteen to twenty four hours prior to the luminometer assay, 25,000 cells/well (2.5E6 cells/10 ml/plate) are plated in 96-well black-sided clear bottom assay plates (Costar #3904).

Media is removed from the wells and replaced with 60 µl of serum free HAM's F12 with 30 mM HEPES (pH 7.5) and 15 µM coelenterazine (Coelenterazine h Luciferin #90608, Assay Designs (Ann Arbor, MI)). The plates are then incubated for 1.5-2 hours. Ten point IC₅₀ compound plates containing 1:3 or 1:5 dilutions of antagonist compounds and an agonist activator plate (20 nM des-Arg10-Kallidin

final concentration, EC_{50}) are prepared using Ham's F12 with 30 mM HEPES, pH 7.5. Following coelenterazine incubation, an automated flash-luminometer platform is used to dispense the B1 antagonist compounds to the cell plate, a CCD camera situated underneath the cell plate takes 12 images of the cell plate at 5 second intervals to determine if there is any agonist activity with the compounds. The hB1 agonist, des-Arg₁₀-Kallidin, is then added to the cell plate and another 12 images are recorded to determine the IC_{50} of the antagonist(s).

B In vitro Assay of hB2 Receptor Function using Calcium Flux

The intracellular calcium flux induced by hB2 receptor activation is analyzed using a hB2 recombinant cell line (CHO-K1) purchased from PerkinElmer (Wellesley, MA, catalog no RBHB2C000EA) on a fluorometric imaging plate reader (FLIPR). The cells are cultured in T225 flask containing Ham's F12 Nutrient Mixture (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, catalog no 11765-047), 10% Fetal Clone II Bovine Serum (HyClone, Logan, UT, catalog no SH3006603), 1 mM Sodium pyruvate (100 mM stock, Invitrogen Corp, catalog no 12454-013), and 0.4 mg/ml Geneticin (G418, 50 mg/ml active geneticin, Invitrogen, catalog no 10131-207). Culture medium is changed every other day 24 hrs prior to the FLIPR assay, the hB2/CHO cells are washed once with PBS (Invitrogen) and 10 ml of Versene (1:5000, Invitrogen, catalog no 15040-066) is added to each flask. After a 5 minute incubation at 37°C, Versene is removed and cells are detached from the flask and resuspended in culture medium. Cells are counted and

25,000 cells/well are plated in 96-well black-sided clear bottom assay plates (Costar, Acton, MA, catalog no 3904) Cells are incubated in a 37 C CO₂ incubator overnight

The media is aspirated from the cells and replaced
5 with 65 µl of dye-loading buffer The loading buffer is prepared by diluting a stock solution of 0.5 mM Fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, OR) dissolved in DMSO containing 10% [w/v] pluronic acid to a concentration of 1 µM in Clear Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
10 containing 0.1% BSA, 20 mM HEPES, and 2.5 mM probenecid (probenecid inhibits activity of the anion transport protein, and thus improves dye loading in the cells) The cells are dye-loaded for 1 hour at room temperature The excess dye is removed by washing the cells two times with
15 assay buffer The assay buffer consists of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing 20 mM HEPES, 0.1% BSA, and 2.5 mM probenecid After the wash cycles, a volume of 100 µL is left in each well, and the plate is ready to be assayed in the FLIPR System Single point (10
20 µM final concentration) POC antagonist compound plates or ten point IC₅₀ compound plates containing 1:3 or 1:5 dilutions of antagonist compounds and an agonist activator plate (0.3 nM bradykinin final concentration, EC₅₀) are prepared using assay buffer The cell plate and the
25 compound plates are loaded onto the FLIPR and during the assay, fluorescence readings are taken simultaneously from all 96 wells of the cell plate Ten 1-second readings are taken to establish a stable baseline for each well, then 25 µL from the B1 antagonist plate is rapidly (50 µL/sec)
30 added The fluorescence signal is measured in 1-second (1 minute) followed by 6-second (2 minutes) intervals for a

total of 3 minutes to determine if there is any agonist activity with the compounds. The B2 agonist, bradykinin, is then added to the cell plate and another 3 minutes are recorded to determine the percent inhibition at 10 μ M (POC plates) or the IC_{50} of the antagonist.

The IC_{50} values for vehicle- or PEG-conjugated peptides tested in the hB1 aequorin assay were on average the slightly reduced in vitro activity conferred to peptides conjugated to larger PEG polymers. For example, the peptide represented by SEQ ID NO 36 and its acetylated form represented by SEQ ID NO 37, resulted in an IC_{50} of 3.0 nM (+/- 5 nM, n=8) and 3.2 nM (+/- 3.2 nM, n=9), respectively at the hB1 receptor. However, the same peptide conjugated to PEG as described herein demonstrated approximately a 10-fold increase in IC_{50} . The native, acetylated, and PEG-conjugate forms of the peptide were inactive up to 10 μ M in the hB2 FLIPR assay. None of the compounds showed agonist activity at either the hB1 or hB2 receptor.

C Tissue based In Vitro Assays of hB1 Receptor Binding Peptides

The antagonist activity and selectivity for bradykinin B1 receptor of the peptides and/or vehicle-conjugated peptides of the present invention were determined with the in vitro human umbilical Vein (HUV) contractility assay described below.

Endothelium-denuded vessels were suspended in 20-ml organ baths containing an oxygenated (95 % O_2 and 5 % CO_2)

and pre-warmed (37°C) standard physiological salt solution of the following composition (in mM) NaCl 118.0, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0 and glucose 11.0 (pH 7.4). High K⁺ solutions (80 mM KCl) were prepared by equimolar replacement of NaCl with KCl. Hoe 140 (1 μM), mergetpa (1 μM) and captopril (10 μM) were also present throughout the experiments to block the B₂ receptors and to prevent peptide degradation, respectively. The tissues were connected to force transducers for isometric tension recordings then allowed to equilibrate for a sufficient time under an optimal resting tension. The experiments were carried out using semi-automated isolated organ systems possessing eight organ baths each, with multichannel data acquisition. The tissues were exposed first to a high K⁺ solution (80 mM KCl) to obtain a control contraction. Following washings and a subsequent 60-min equilibration period, the tissues were exposed to cumulative increasing concentrations of the reference agonist Lys-desArg⁹-BK to obtain concentration-response curves in the absence (control preparations) or presence of various concentrations of the test compounds or the reference antagonist Lys-desArg⁹[Leu⁸]-BK (test preparations), which were added 15 min before the exposure to Lys-desArg⁹-BK. A concentration-response curve to Lys-desArg⁹-BK was generated in each preparation.

The parameter measured was the maximal change in tension induced by each agonist concentration and the results expressed as a percent of the control responses to KCl. The EC₅₀ values of the agonist (concentration producing a half-maximum response) were calculated by

linear regression analysis of its concentration-response curves. The antagonist potencies of the test compounds and Lys-desArg9[Leu8]-BK were evaluated in terms of pA₂ values (-log concentration producing a two-fold rightward shift of the agonist concentration-response curve), which were calculated according to Van Rossum (Van Rossum, J M, Cumulative dose-response curves II Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters Arch Int Pharmacodyn Ther, 143 299-330 (1963)). The pA₂ values were calculated using only antagonist concentrations that caused a significant rightward shift of the agonist concentration-response curve. The pA₂ values are given as the mean $\pm$ s e m of three determinations. Statistical significance of the differences was determined using Student's t test and p values < 0.05 were considered statistically significant.

D In vitro B1-Inhibition Activity of Peptides and/or Conjugated Peptides

The effectiveness of the peptides and/or conjugated peptides as inhibitors of B1 activity (i.e., B1 "neutralization") can also be evaluated by measuring the ability of each peptide and/or conjugated peptide to block B1 stimulated CGRP and substance P release and calcium signaling in Dorsal Root Ganglion (DRG) neuronal cultures.

Dorsal Root Ganglion Neuronal Cultures Dorsal root ganglia are dissected one by one under aseptic conditions from all spinal segments of embryonic 19-day old (E19)

rats that are surgically removed from the uterus of timed-pregnant, terminally anesthetized Sprague-Dawley rats (Charles River, Wilmington, MA) DRG are collected in ice-cold L-15 media (GibcoBRL, Grand Island, NY)

5 containing 5% heat inactivated horse serum (GibcoBRL), and any loose connective tissue and blood vessels are removed The DRG are rinsed twice in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), pH 7.4 (GibcoBRL) The DRG are then dissociated into single cell suspension using

10 a papain dissociation system (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ) Briefly, DRG are incubated in a digestion solution containing 20 U/ml of papain in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) at 37°C for fifty minutes Cells are dissociated by trituration through fire-polished

15 Pasteur pipettes in a dissociation medium consisting of MEM/Ham's F12, 1:1, 1 mg/ml ovomucoid inhibitor and 1 mg/ml ovalbumin, and 0.005% deoxyribonuclease I (DNase) The dissociated cells are pelleted at 200 x g for five minutes and re-suspended in EBSS containing 1 mg/ml

20 ovomucoid inhibitor, 1 mg/ml ovalbumin and 0.005% DNase Cell suspension is centrifuged through a gradient solution containing 10 mg/ml ovomucoid inhibitor, 10 mg/ml ovalbumin at 200 x g for six minutes to remove cell debris, and then filtered through a 88- μm nylon mesh

25 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) to remove any clumps Cell number is determined with a hemocytometer, and cells are seeded into poly-ornithine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma, St Louis, MO) and mouse laminin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (GibcoBRL)-coated 96-well plates at 10×10^3 cells/well in complete medium The

30 complete medium consists of minimal essential medium (MEM) and Ham's F12, 1:1, penicillin (100 U/ml), streptomycin

105

(100 μ g/ml), and 10% heat inactivated horse serum (GibcoBRL). The cultures are kept at 37°C, 5% CO₂, and 100% humidity. For controlling the growth of non-neuronal cells, 5-fluoro-2'-deoxyuridine (75 μ M) and uridine (180 μ M) are included in the medium.

Treatment with B1 and anti-B1 peptides and/or anti-B1 conjugated peptides Two hours after plating, cells are treated with recombinant human β -B1 or recombinant rat β -B1 at a concentration of 10 ng/ml (0.38 nM). Positive controls comprising serial-diluted anti-B1 antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) are applied to each culture plate. Test peptides or test conjugated peptides (e.g., from Example 1) are added at ten concentrations using 3 16-fold serial dilutions. All samples are diluted in complete medium before being added to the cultures. Incubation time is generally around 40 hours prior to measurement of VR1 expression.

Measurement of VR1 Expression in DRG Neurons Cultures are fixed with 4% paraformaldehyde in Hanks' balanced salt solution for fifteen minutes, blocked with Superblock (Pierce, Rockford, IL), and permeabilized with 0.25% Nonidet P-40 (Sigma) in Tris HCl (Sigma)-buffered saline (TBS) for one hour at room temperature. Cultures are rinsed once with TBS containing 0.1% Tween 20 (Sigma) and incubated with rabbit anti-VR1 IgG (prepared at Amgen) for one and one-half hours at room temperature, followed by incubation of Eu-labeled anti-rabbit second antibody (Wallac Oy, Turku, Finland) for one hour at room temperature. Washes with TBS (3 x five minutes with slow

shaking) are applied after each antibody incubation Enhance solution (150 µl/well, Wallac Oy) is added to the cultures The fluorescence signal is then measured in a time-resolved fluorometer (Wallac Oy) VR1 expression in samples treated with the vehicle-conjugated peptides is determined by comparing to a standard curve of B1 titration from 0-1000 ng/ml Percent inhibition (compared to maximum possible inhibition) of B1 effect on VR1 expression in DRG neurons is determined by comparing to controls that are not B1-treated

Impaired receptor binding and functional activity for each of the PEG-conjugated peptide B1 antagonists was directly related to the size of the PEG group added and ranged from ~5-200 fold reductions in potency Polyglycine linkers of ~5-7 residues worked well to preserve function while longer linkers either showed little improvement ("flexible linker") or proved to be a detriment to activity ("rigid linker") Finally, Table 8 illustrates the breadth of this application with a variety of different PEG-conjugated peptide B1 antagonists

27

Table 8 Binding affinity (K_i) and Functional potency (IC₅₀) at the human B1 receptor (hB1) for peptide and PEGylated peptide antagonists

Activated PEG reagent	Peptides per PEG	Peptide (X ¹) - (Y ¹) _{0 or 1}	hB1 K _i (nM)	hB1 IC ₅₀ (nM)
MeO-20K-Maleimide ^a	1	SEQ ID NO 28	114	110
MeO-20K-Maleimide ^a	1	SEQ ID NO 29	252	237
MeO-20K-Maleimide ^a	1	SEQ ID NO 30	230	81
MeO-20K-Maleimide ^a	1	SEQ ID NOS 29 + 42	22	54
MeO-20K-Maleimide ^a	1	SEQ ID NO 32	9	89
MeO-20K-Maleimide ^a	1	SEQ ID NO 33	75	98
MeO-20K-propionaldehyde ^b	1	SEQ ID NO 13	1	35
Maleimide-20K-Maleimide ^a	2	SEQ ID NO 33	11	77
MeO-20K SPA ^c	1	SEQ ID NO 13	10	52
Tetrakis-20K-SPA ^c	4	SEQ ID NO 13	0.14	10
Tetrakis-20K-SPA ^d	4	SEQ ID NO 13	0.14	10
none	NA	SEQ ID NO 13	0.10	0.5
none	NA	SEQ ID NO 15	0.19	1
none	NA	SEQ ID NO 49	0.77	0.5
none	NA	SEQ ID NO 50	0.2	8
none	NA	SEQ ID NO 22	0.38	2
None	NA	SEQ ID NO 37	0.8	1

- 5 a Generated by one-pot process described in Scheme 4,
- b Reductive amination at N-terminal residue, epsilon amine,
- c acylated on the N-terminal residue, epsilon amine,
- d acylated on the N-terminal residue, alpha amine

10

Example 7 Determination of Stability of Peptides and/or Conjugated Peptides

15 A Rat Kidney Brush Border Microvilli Assay

 Kidney membranes are prepared according to the procedure set forth in by Booth et al (Biochemical Journal, 142 575 (1974)) Protein concentrations are determined by the method of Bradford (Anal Biochemistry ,

20 72 248-254 (1976))

B Rat or Human Lung S9 Homogenate Assay

Rat or Human lung is prepared as described by Skidgel et al (Biochemical Pharmacology 33 3471 (1984))

5 The test compounds are prepared at 1 mM concentration in a PBS solution (pH = 7.1). Test compounds are added to a preparation of tissue from procedure A or B (final protein concentration of 2 mg/ml) and incubated at 37 °C. At various time points, the protein is precipitated with
10 acetonitrile, 0.1M HCl in acetonitrile or 10% TFA in water. The precipitate is removed by centrifugation, and the filtrate further filtered through a 0.1 µm membrane. The sample is then analyzed by reverse phase HPLC (4.6 x 300 mm Novapak HR C18 (Waters Corporation, Milford, MA) flow = 1 mL/min, linear gradient from 10% ACN (0.1% Formic acid) - 90% water (0.1% Formic acid) to 50% ACN (0.1% Formic acid) - 50% water (0.1% Formic acid) over 20 minutes) with mass spectroscopy detection. The concentration of the test compound at time T relative to
20 the internal standard is fitted to a first order loss function ($[\text{compound}]_t = [\text{compound}]_0 (1 - e^{kt})$), "[compound]₀" and "[compound]_t" are the concentration of test compound at time zero and the concentration of test compound at the time the sample is withdrawn,
25 respectively, the variable "t" is the time the sample is withdrawn for analysis, and k is the rate of test compound concentration change. The variable "k" is determined by using a non-linear regression approach supplied by the JMP Statistical software package. Given that the test
30 compound concentration decreases over time, the values of "k" are negative. The half-life is calculated from the

model derived value of "k" using the following formula T
 $k = (\ln 2)/k$

**Example 8 In vivo antinociceptive activity of anti-B1
5 peptides and vehicle-conjugated anti-B1 peptides in rat
and monkey pain models**

A Rat Neuropathic Pain Model Male Sprague-
Dawley rats (200 g) are anesthetized with isoflurane
10 inhalant anesthesia and the left lumbar spinal nerves at
the level of L5 and L6 are tightly ligated (4-0 silk
suture) distal to the dorsal root ganglion and prior to
entrance into the sciatic nerve, as first described by Kim
and Chung (An experimental model for peripheral neuropathy
15 produced by segmental spinal nerve ligation in the rat
Pain 50 355-363, (1992)) The incisions are closed and
the rats are allowed to recover This procedure results
in mechanical (tactile) allodynia in the left hind paw as
assessed by recording the pressure at which the affected
20 paw (ipsilateral to the site of nerve injury) was
withdrawn from graded stimuli (von Frey filaments ranging
from 4.0 to 148.1 mN) applied perpendicularly to the
plantar surface of the paw (between the footpads) through
wire-mesh observation cages A paw withdrawal threshold
25 (PWT) was determined by sequentially increasing and
decreasing the stimulus strength and analyzing withdrawal
data using a Dixon non-parametric test, as described by
Chaplan, S R , et al (Quantitative assessment of tactile
allodynia in the rat paw J Neurosci Meth, 53 55-63
30 (1994))

115

Normal rats and sham surgery rats (nerves isolated but not ligated) withstand at least 148.1 mN (equivalent to 15 g) of pressure without responding. Spinal nerve ligated rats respond to as little as 4.0 mN (equivalent to 0.41 g) of pressure on the affected paw. Rats are included in the study only if they did not exhibit motor dysfunction (e.g., paw dragging or dropping) and their PWT was below 39.2 mN (equivalent to 4.0 g). At least seven days after surgery rats are treated with test peptides or test vehicle-conjugated peptides (usually a screening dose of about 1 mg/kg and about 60 mg/kg, respectively) or control diluent (PBS) once by s.c. injection and PWT was determined each day thereafter for 7 days.

15 B Rat CFA Inflammatory Pain Model Male Sprague-Dawley rats (200 g) are lightly anesthetized with isoflurane inhalant anesthesia and the left hindpaw is injected with complete Freund's adjuvant (CFA), 0.15 ml. This procedure results in mechanical (tactile) allodynia in the left hind paw as assessed by recording the pressure at which the affected paw is withdrawn from graded stimuli (von Frey filaments ranging from 4.0 to 148.1 mN) applied perpendicularly to the plantar surface of the paw (between the footpads) through wire-mesh observation cages. PWT is determined by sequentially increasing and decreasing the stimulus strength and analyzing withdrawal data using a Dixon non-parametric test, as described by Chaplan et al (1994). Rats are included in the study only if they do not exhibit motor dysfunction (e.g., paw dragging or dropping) or broken skin and their PWT is below 39.2 mN (equivalent to 4.0 g). At least seven days after CFA

injection rats are treated with test peptides and/or test vehicle-conjugated peptides (usually a screening dose of 60 mg/kg) or control solution (PBS) once by s c injection and PWT is determined each day thereafter for 7 days

5 Average paw withdrawal threshold (PWT) was converted to percent of maximum possible effect (%MPE) using the following formula $\%MPE = 100 * (PWT \text{ of treated rats} - PWT \text{ of control rats}) / (15 - PWT \text{ of control rats})$ Thus, the cutoff value of 15 g (148.1 mN) is equivalent to 100% of
10 the MPE and the control response is equivalent to 0% MPE

Preferred peptides and vehicle-conjugated peptides of the present invention are expected to produce an antinociceptive effect with a PD relationship at a screening dose of about 1 mg/kg and about 60 mg/kg,
15 respectively

B Green Monkey LPS Inflammation Model The effectiveness of peptides and/or conjugated peptides as inhibitors of B1 activity may be evaluated in Male green
20 monkeys (*Cercopithecus aethiops* St Kitts) challenged locally with B1 agonists essentially as described by deBlois and Horlick (British Journal of Pharmacology 132 327-335 (2002)), which is hereby incorporated by reference in its entirety)

25 In order to determine whether PEG-conjugated peptide antagonists of the present invention inhibit B1 induced oedema the studies described below were conducted on male green monkeys (*Cercopithecus aethiops* St Kitts) at the Caribbean Primates Ltd experimental farm (St Kitts, West
30 Indies) Procedures were reviewed and accepted by the Animal Care Committees of the CR-CHUM (Montreal, Canada)

and of Caribbean Primates Ltd (St Kitts, West Indies)
Animals weighing 6.0 ± 0.5 kg ($n=67$) were anaesthetized (50
mg ketamine kg^{-1}) and pretreated with a single intravenous
injection of LPS ($90 \mu\text{g kg}^{-1}$) or saline (1 ml) via the
5 saphenous vein

1 Inflammation studies

Kinin-induced oedema was evaluated by the ventral
skin fold assay (Sciberras et al, 1987) Briefly,
10 anaesthetized monkeys were injected with captopril (1 mg
 kg^{-1} 30 min before assay) A single subcutaneous injection
of dKD, BK or the vehicle (2 mM amastatin in 100 μl
Ringer's lactate) was given in the ventral area and the
increase in thickness of skin folds was monitored for 30-45
15 min using a calibrated caliper The results were expressed
as the difference between the skin fold thickness before
and after the subcutaneous injection Captopril and
amastatin were used to reduce degradation of kinins at the
carboxyl- and amino-terminus, respectively

20

ANTAGONIST SCHILD ANALYSIS

The dose-response relationship for dKD (1-100 nmol)-
induced oedema was determined at 24 h post-LPS in the
absence or presence of different concentrations of PEG-
25 peptide antagonist BK (30 nmol) was used as a positive
control

ANTAGONIST TIME COURSE

The time course of inhibition by antagonist was determined
30 at 4, 24, 48, 72 and/or 96 h after single bolus

administration BK (30 nmol) was used as a positive control

DRUGS

- 5 Ketamine hydrochloride, LPS, amastatin and captopril were from Sigma (MO, U S A) All peptides were from Phoenix Pharmaceuticals (CA, U S A)

STATISTICS

- 10 Values are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (s e mean) In edema studies, the pre-injection thickness of the skin folds was subtracted from the values after subcutaneous challenge Curve fitting and EC₅₀ calculations were obtained using the Delta Graph 4 0
- 15 software for Apple Computers Data were compared by two-way analysis of variance followed by unpaired, one tail Student's t-test with Bonferroni correction $p < 0.05$ was considered statistically significant

- 20 LPS administration to green monkeys increased from a null level their sensitivity to a B₁ receptor agonist in an edema formation assay Comparatively, responses to the B₂ receptor agonist BK were not affected

- 25 Surprisingly, a single subcutaneous dose at 10 mg/kg of a representative 5kD PEG-conjugated peptide and a 20 kD PEG-conjugated peptide of the same peptide analog was sufficient to relieve a pre-established B1 agonist induced inflammatory response and suppress successive daily agonist challenges for 3 and 4 days, respectively No tachyphalaxis was observed with B1 challenge up to 96 h
- 30 The effect was also determined to be selective at B1 rather than B2 Furthermore, the 5K PEG-conjugate

inhibited edema in response to dKD challenge longer than the unconjugated (i.e., native peptide) peptide although rapid onset and efficacy was comparable for both molecules up to 125 hours

5

Example 9 Rat Pharmacokinetic Studies

Various peptides or conjugated peptides (in an aqueous medium) were dosed as a bolus to male Sprague-Dawley rats via an intravenous (iv) or subcutaneous (sc) route. Blood samples were collected at various time points (e.g., 0, 15, 30 minutes and/or 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 240, and/or 320 hours after the injection) into heparized tubes. Plasma was removed from pelleted cells upon centrifugation and either frozen or immediately processed. The compound of interest in the plasma was quantitated by an analyte-specific LC-MS/MS or an ELISA method. Various standard pharmacokinetic parameters such as clearance (CL), apparent clearance (CL/F), volume of distribution (V_{ss}), mean residence time (MRT), area under the curve (AUC), and terminal half-life (t_{1/2}) were calculated by non-compartmental method (for example, see Table 9)

10

15

20

Table 9: Peptide and PEGylated peptide B1 antagonists
Pharmacokinetic Studies in Rat

Activated PEG reagent	Peptides per PEG	Peptide	t _{1/2} (h)	AUC 0 - inf
MeO-20K-Maleimide ^a	1	SEQ ID NO 33	-	28387
MeO-20K-propionaldehyde ^b	1	SEQ ID NO 13	33.7 ^c	16877 ^c
Maleimide-20K-Maleimide ^a	2	SEQ ID NO 33	25.6 ^c	28580 ^c
MeO-20K SPA ^d	1	SEQ ID NO 13	27.3 ^c	10701 ^c
Tetrakis-20K-SPA ^d	4	SEQ ID NO 13	28.7 ^a	8475 ^a
Tetrakis-20K-SPA ^f	4	SEQ ID NO 13	30.8 ^a	83239 ^e
none	NA	SEQ ID NO 13	1.2 ^g	255 ^g
none	NA	SEQ ID NO 15	2.76 ^c	7720 ^c
none	NA	SEQ ID NO 13	0.6 ^h	9 ^h
none	NA	SEQ ID NO 49	1.0 ⁱ	13862 ⁱ
none	NA	SEQ ID NO 50	2.0 ⁱ	5529 ⁱ
none	NA	SEQ ID NO 22	1.0 ⁱ	7891 ⁱ
None	NA	SEQ ID NO 37	0.4 ⁱ	1122 ⁱ
None	NA	SEQ ID NO 37	0.6 ^g	18288 ^g

- a Generated by one-pot process described in Scheme 4,
b Reductive amination at N-terminal residue, epsilon amine,
c 1 mpk sc,
d acylated on the N-terminal residue, epsilon amine,
e 0.5 mpk sc,
f acylated on the N-terminal residue, alpha amine
g 30 mpk sc, h 1 mpk iv, and i 3 mpk iv

It will be appreciated that various modifications may be made in the invention as described above. Accordingly, the scope of the invention is defined in the following claims

CLAIMS

What is claimed is

- 5 1 A composition of matter of the formula
F-[(X¹)-(Y¹)_n], or a physiologically acceptable salt
thereof wherein
 X¹ and Y¹ are independently in each instance peptides
of the formula -L¹-P¹ and -L²-P², respectively,
10 F is a vehicle covalently bound to X¹ or Y¹,
 L¹ and L² are independently in each instance absent or
linkers having from 0 to 9 amino acid residues,
 n is 0 to 3, and
 P¹ and P² are independently in each instance peptide
15 antagonists of the bradykinin B1 receptor
- 2 A composition of matter of the formula
F'-R_n, or a physiologically acceptable salt thereof
wherein
20 F' is a multivalent vehicle,
 R is independently in each instance -(X¹)-(Y¹)_n
wherein R is covalently bound to F',
 X¹ and Y¹ are independently in each instance peptides
of the formula -L¹-P¹ and -L²-P², respectively,
25 L¹ and L² are independently in each instance absent or
linkers having from 0 to 9 amino acid residues,
 n is 0 to 3,
 Z is 2 to 8, and
 P¹ and P² are independently in each instance peptide
30 antagonists of the bradykinin B1 receptor

3 The composition of matter of any of claims 1-2
wherein P¹ and P² are independently in each instance
peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor selected
from the group of peptides consisting of the peptides
5 shown in SEQ ID NOS 5-26, 43-60, and derivatives thereof

4 The composition of matter of any one of claims 1-
2 wherein X¹ is a peptide having an amino acid sequence
selected from the group consisting of the peptides shown
10 in SEQ ID NOS 27-41, and derivatives thereof

5 The composition of matter of any one of claims 1-
2 wherein n is 1 and P² is a peptide having a sequence as
shown in SEQ ID NO 42

15

6 The composition of matter of any one of claims 1-
2 wherein n is 0

7 The composition of matter of any one of claims 1-
20 2 wherein P¹ and P² are independently in each instance
peptide antagonists from the group of peptides consisting
of peptides defined by the formula



wherein

25 a⁰ is a basic or neutral aromatic, aliphatic,
heterocyclic, or alicyclic amino acid, a basic di-peptide,
or absent,

30 a¹, a², a³ and a⁴ are independently in each instance
basic or neutral aromatic, aliphatic, heterocyclic, or
alicyclic amino acids,

a⁶ is Ser,

a⁵, a⁷, and a⁸ are independently in each instance aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acids, provided that at least one of a⁵, a⁷, and a⁸ is selected from Chg, Cpg, Igl^a, Igl^b, Nig^a and Nig^b of the D- or L- configuration, and

a⁹, a¹⁰, a¹¹, a¹², a¹³, and a¹⁴ are independently in each instance a natural amino acid or absent

8 The composition of matter of claim 7 wherein

10 a⁰ is a basic amino acid or basic di-peptide or absent,

a¹ is a basic amino acid or basic di-peptide,

a² is Pro,

a³ is Hyp,

15 a⁴ is Gly,

a⁵ and a⁸ are independently in each instance Indanyl amino acids,

a⁶ is Ser,

a⁷ is a D-Indanyl amino acid,

20 a⁹ is Cpg, and

a⁹, a¹⁰, a¹¹, a¹², a¹³, and a¹⁴ are independently in each instance a natural amino acid or absent

9 The composition of matter of claim 7 wherein

25 a⁰ is an amino acid selected from the group consisting of Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, DLys, or a di-peptide consisting of two amino acids independently selected from the group consisting of Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, or DLys,

30 a¹ is Arg,

a² is Pro,

a³ is Hyp,
a⁴ is Gly,
a⁵ is Cpg,
a⁶ is Ser,
5 a⁷ is DTic, and
a⁸ is Cpg

10 The composition of matter of claim 7 wherein
a⁰ is Lys-Lys,
10 a¹ is Arg,
a² is Pro,
a³ is Hyp,
a⁴ is Gly,
a⁵ is Iglb,
15 a⁶ is Ser,
a⁷ is DIglb, and
a⁸ is Oic

20 11 The composition of matter of claim 7 wherein
a⁰ is DArg,
a¹ is Arg,
a² is Pro,
a³ is Hyp,
a⁴ is Gly,
25 a⁵ is Igl,
a⁶ is Ser,
a⁷ is DIgl, and
a⁸ is Oic

30 12 A composition of matter of any one of the claims
1-2 wherein P¹ and P² are independently in each instance

peptide antagonists from the group of peptides consisting of peptides defined by the formula



wherein

5 a^0 is absent or a basic amino acid or a basic di-peptide,

a^1 is Arg,

a^2 is Pro,

a^3 is Pro,

10 a^4 is Gly,

a^5 is Me-Phe,

a^6 is Ser,

a^7 is D- β -Nal, and

a^8 is Ile

15

13 The composition of matter of any one of claims 1-2 wherein said L^1 is a peptidyl linker having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 100 to SEQ ID NO 105, inclusive

20

14 The composition of matter of claim 3 wherein said L^1 is a peptidyl linker having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 100 to SEQ ID NO 105, inclusive

25

15 A method of treating, preventing, or ameliorating a disease or condition associated with or mediated by B1 activity comprising administering to a human or animal subject a therapeutically effective amount of the
30 composition of matter according to any one of claims 1-2

16 A method of treating, preventing, or
ameliorating a disease or condition associated with or
mediated by B1 activity comprising administering to a
human or animal subject a therapeutically effective amount
5 of the composition of matter according to claim 3

17 The method according to claim 15 wherein the
disease or condition is selected from the group consisting
of inflammation, inflammatory pain, acute pain, dental
10 pain, back pain, lower back pain, pain from trauma,
surgical pain, inflammatory bowel disorders, asthma, and
allergic rhinitis

18 The method according to claim 16 wherein the
15 disease or condition is selected from the group consisting
of inflammation, inflammatory pain, acute pain, dental
pain, back pain, lower back pain, pain from trauma,
surgical pain, inflammatory bowel disorders, asthma, and
allergic rhinitis

20

19 A pharmaceutical composition comprising a
composition of matter according to any one of claims 1-2,
and at least one pharmaceutically-acceptable diluent,
excipient, or carrier

25

20 A composition of matter of the formula
 $F-[(X^1)-(Y^1)_n]$, or a physiologically acceptable salt
thereof wherein

X^1 and Y^1 are independently in each instance peptides
30 of the formula $-L^1-P^1$ and $-L^2-P^2$, respectively,

F is a PEG covalently bound to X^1 or Y^1 ,

L¹ and L² are independently in each instance absent or linkers having from 0 to 9 amino acid residues,

n is 0 to 3, and

P¹ and P² are independently in each instance peptide
5 antagonists of the bradykinin B1 receptor

21 The composition of matter of claim 2 wherein F' is a multivalent PEG

10 22 The composition of matter of any one of claims 20-21 wherein P¹ and P² are independently in each instance peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor selected from the group of peptides consisting of the peptides shown in SEQ ID NOS 5-60 and derivatives thereof

15 23 The composition of matter of claim 21 wherein X¹ is a peptide having a amino acid sequence selected from the group consisting of the peptides as shown in SEQ ID NOS 27-41 and derivatives thereof

20 24 The composition of matter of claim 21 wherein n is 0 and Z is 2-8

25 25 The composition of matter of claim 24 wherein Z is 4

26 A composition of matter of the formula F-[(X¹)-(Y¹)_n], or a physiologically acceptable salt thereof wherein

30 X¹ and Y¹ are independently in each instance peptides of the formula -L¹-P¹ and -L²-P², respectively,

- 118 -

F is a vehicle covalently bound to X¹ or Y¹,

L¹ and L² are independently in each instance absent or linkers having from 0 to 9 amino acid residues,

n is 0 to 3, and

5 P¹ and P² are independently in each instance peptide antagonists from the group of peptides consisting of peptides defined by the formula



wherein

10 a⁰ is a basic or neutral aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acid, basic di-peptide, or absent,

a¹, a², a³ and a⁴ are independently in each instance basic or neutral aromatic, aliphatic, heterocyclic, or
15 alicyclic amino acids,

a⁶ is Ser,

a⁵, a⁷, and a⁸ are independently in each instance aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acids, provided that at least one of a⁵, a⁷, and a⁸ is
20 selected from Chg, Cpg, Igl^a, Igl^b, Nig^a and Nig^b of the D- or L- configuration, and

a⁹, a¹⁰, a¹¹, a¹², a¹³, and a¹⁴ are independently in each instance a natural amino acid or absent

25 27 A composition of matter of the formula F'-R_n, or a physiologically acceptable salt thereof wherein

F' is a multivalent vehicle,

R is independently in each instance -(X¹)-(Y¹)_n

30 wherein R is covalently bound to F',

X¹ and Y¹ are independently in each instance peptides of the formula -L¹-P¹ and -L²-P², respectively,

L¹ and L² are independently in each instance absent or linkers having from 0 to 9 amino acid residues,

5 n is 0 to 3,

Z is 2 to 8, and

P¹ and P² are independently in each instance peptide antagonists from the group of peptides consisting of peptides defined by the formula

10 NH₂-a⁰a¹a²a³a⁴a⁵a⁶a⁷a⁸a⁹a¹⁰a¹¹a¹²a¹³a¹⁴-COOH

wherein

a⁰ is a basic or neutral aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acid, basic di-peptide, or absent,

15 a¹, a², a³ and a⁴ are independently in each instance basic or neutral aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acids,

a⁴ is Ser,

20 a⁵, a⁷, and a⁸ are independently in each instance aromatic, aliphatic, heterocyclic, or alicyclic amino acids, provided that at least one of a⁵, a⁷, and a⁸ is selected from Chg, Cpg, Igl_a, Igl_b, Nig_a and Nig_b of the D- or L- configuration, and

25 a⁹, a¹⁰, a¹¹, a¹², a¹³, and a¹⁴ are independently in each instance a natural amino acid or absent

28 The composition of matter of any one of claims 26-27 wherein

30 a⁰ is a basic amino acid, a basic di-peptide, or absent,

a¹ is a basic amino acid,

a² is Pro,
a³ is Hyp,
a⁴ is Gly,
a⁵ and a⁸ are independently in each instance Indanyl
5 amino acids,
a⁶ is Ser,
a⁷ is a D-Indanyl amino acid,
a⁸ is Cpg, and
a⁹, a¹⁰, a¹¹, a¹², a¹³, and a¹⁴ are independently in each
10 instance a amino acid or absent

29 The composition of matter of any one of claims
26-27 wherein

a⁰ is an amino acid selected from the group consisting
15 of Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, DLys, or a di-peptide
consisting of two amino acids independently selected from
the group consisting of Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, or
DLys,

a¹ is Arg,
20 a² is Pro,
a³ is Hyp,
a⁴ is Gly,
a⁵ is Cpg,
a⁶ is Ser,
25 a⁷ is DTic, and
a⁸ is Cpg

30 The composition of matter of any one of claims
26-27 wherein

30 a⁰ is D-Arg, or a dipeptide selected from the group
consisting of Lys-Lys, DLys-Lys, and DOrn-Lys,

a¹ is Arg,
a² is Pro,
a³ is Hyp,
a⁴ is Gly,
5 a⁵ is Iglb,
a⁶ is Ser,
a⁷ is DIglb, and
a⁸ is Oic

10 31 The composition of matter of any one of claims
26-27 wherein

a⁰ is DArg or a Lys-Lys di-peptide,
a¹ is Arg,
a² is Pro,
15 a³ is Hyp,
a⁴ is Gly,
a⁵ is Igl,
a⁶ is Ser,
a⁷ is DIgl, and
20 a⁸ is Oic

32 A composition of matter of any one of claims 1-2
wherein P¹ and P² are independently in each instance
peptide antagonists from the group of peptides consisting
25 of peptides defined by the formula



wherein

a⁰ is an amino acid selected from the group consisting
of Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, DLys, or a dipeptide
30 consisting of two amino acids independently selected from

the group consisting of Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, or DLys,

- a¹ is Arg,
- a² is Pro,
- 5 a³ is Pro,
- a⁴ is Gly,
- a⁵ is Me-Phe,
- a⁶ is Ser,
- a⁷ is D-β-Nal, and
- 10 a⁸ is Ile

33 The composition of matter of claim 32 wherein said L¹ is a peptidyl linker having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 100 to SEQ
15 ID NO 105, inclusive

34 The composition of matter of claim 33 wherein said polyethylene glycol has an average molecular weight selected from the group consisting of

- 20 i 5,000 Daltons,
- ii 20,000 Daltons,
- iii 24,000 Daltons,
- iv 30,000 Daltons,
- v 40,000 Daltons, and
- 25 vi 60,000 Daltons

35 The composition of matter of claim 34 wherein said composition of matter is capable of antagonizing B1 receptor activity in vitro and has a therapeutically
30 acceptable half-life in vivo in mammals

36 A method of treating, preventing, or ameliorating
a disease or condition associated with or mediated by B1
activity comprising administering to a human or animal
subject a therapeutically effective amount of the
5 composition of matter according to claim 34

37 The method according to claim 35 wherein the
disease or condition is selected from the group consisting
of inflammation, inflammatory pain, acute pain, dental
10 pain, back pain, lower back pain, pain from trauma,
surgical pain, inflammatory bowel disorders, asthma, and
allergic rhinitis

38 A pharmaceutical composition comprising the
15 composition of matter according to claim 34 and at least
one pharmaceutically-acceptable diluent, excipient, or
carrier

39 The use of the composition of matter according
20 to claim 34 in the manufacture of a medicament for the
treatment of a disease or condition selected from the
group consisting of inflammation, inflammatory pain, acute
pain, dental pain, back pain, lower back pain, pain from
trauma, surgical pain, inflammatory bowel disorders,
25 asthma, and allergic rhinitis

40 A peptide antagonist of the bradykinin B1
receptor comprising a sequence of amino acids selected
from the group consisting of SEQ ID NOS 15-35, 39-54,
30 derivatives thereof, and a physiologically acceptable salt
thereof

41 A peptide antagonist of the bradykinin B1
receptor comprising a sequence of amino acids selected
from the group consisting of SEQ ID NOS 15-35 or a
5 physiologically acceptable salt thereof

42 The peptide of claim 41 comprising a sequence of
amino acids selected from the group consisting of SEQ ID
NOS 15-26
10

43 The peptide of claim 40 wherein the N-terminal
amino acid is a D-amino acid

44 The peptide of claim 43 wherein the N-terminal
15 amino acid is selected from the group consisting of D-Dab
DLys DArg and DOrn

45 A pharmaceutical composition comprising a
peptide antagonist of the bradykinin B1 receptor
20 comprising a sequence of amino acids selected from the
group consisting of SEQ ID NOS 15-35 and at least one
pharmaceutically-acceptable diluent excipient, or
carrier

25 46 A method of treating preventing or ameliorating
a disease or condition associated with or mediated by B1
activity comprising administering to a human or animal
subject a therapeutically effective amount of a
pharmaceutical composition comprising a peptide antagonist
30 of the bradykinin B1 receptor comprising a sequence of
amino acids selected from the group consisting of SEQ ID

NOS 15-35 and at least one pharmaceutically-acceptable
diluent, excipient, or carrier

47 The method according to claim 46 wherein the
5 disease or condition is selected from the group consisting
of inflammation, inflammatory pain, acute pain, dental
pain, back pain, lower back pain, pain from trauma,
surgical pain, inflammatory bowel disorders, asthma, and
allergic rhinitis

10

48 The use of a pharmaceutical composition
according to claim 19 in the manufacture of a medicament
for the treatment of a disease or condition selected from
the group consisting of inflammation, inflammatory pain,
15 acute pain, dental pain, back pain, lower back pain, pain
from trauma, surgical pain, inflammatory bowel disorders,
asthma, and allergic rhinitis

49 The use of a pharmaceutical composition
20 according to claim 45 in the manufacture of a medicament
for the treatment of a disease or condition selected from
the group consisting of inflammation, inflammatory pain,
acute pain, dental pain, back pain, lower back pain, pain
from trauma, surgical pain, inflammatory bowel disorders,
25 asthma, and allergic rhinitis

Abstract

The present invention relates to certain biologically active peptides and conjugated peptides which can be used
5 as therapeutics or prophylactics against diseases or conditions linked to B1 as the causative agent In a preferred embodiment of the invention biologically active PEG-conjugated peptides are provided In one aspect of the present invention, pharmacologically active PEG-
10 conjugated peptides of the present invention are useful to treat inflammation or pain

A-836B PCT SEQ ST25 txt
SEQUENCE LISTING

<110> Amgen Inc
<120> ANTAGONISTS OF THE BRADYKININ B1 RECEPTOR
<130> A-836B
<140> Not Yet Rec'd
<141> 2004-10-22
<150> 60/538,929
<151> 2004-01-24
<150> Not Yet Received
<151> 2004-10-21
<150> 60/513,913
<151> 2003-10-22
<160> 60
<170> PatentIn version 3 2
<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Human
<400> 1

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> HUMAN
<400> 2

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 3

Met Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 4

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

A-836B PCT SEQ ST25 txt

1

5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 5

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 6

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Thi

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as DTic

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as DTc

<400> 7

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg

134

A-836B PCT SEQ ST25 txt
10

1

5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Thi

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as DTic

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Oic

<400> 8

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Thi

<220>

135

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as DHpe

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Oic

<400> 9

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as MePhe

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as D-Beta-Nal

<400> 10

Leu Leu Arg Pro Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Igl

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Dlg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Oic

<400> 11

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Igl

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dlg

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Oic

<400> 12

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

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature

137

A-8368 PCT SEQ ST25 txt

<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as ptic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 13

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

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Igl

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Df5f

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Igl

<400> 14

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<223> ARTIFICIAL

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DOrn

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 15

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DOrn

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Thz

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 16

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

131

A-836B PCT SEQ ST25 txt
10

1

5

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

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as 3Pa1

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 17

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as 4Pa1

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

840

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<221> misc_feature
 <222> (9) (9)
 <223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) (10)
 <223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 18

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa at position 1 is defined as Cha

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) (4)
 <223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) (6)
 <223> Xaa at position 6 is defined as Cpg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8) (8)
 <223> Xaa at position 8 is defined as Dtic

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) (9)
 <223> Xaa at position 9 is defined as Cpg

<400> 19

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa at position 1 is defined as 2Na1

141

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Cpg

<400> 20

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220> ~~ARTIFICIAL PEPTIDE~~

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Cpg

<400> 21

Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (1)

<223> Xaa at position 1 is defined as DLys

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) (5)

<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 22

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) (2)

<223> Xaa at position 2 is defined as DOrn

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) (5)

<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

H3

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<400> 23

Leu Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (2) (2)
<223> Xaa at position 2 is defined as Cha

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 24

Leu Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (2) (2)
<223> Xaa at position 2 is defined as Abu

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

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

1241

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 25

Leu	Xaa	Arg	Pro	Xaa	Gly	Xaa	Ser	Xaa	Xaa
1			5					10	

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) (2)

<223> Xaa at position 1 is defined as 2NaI

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) (3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) (5)

<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (6) (6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (8) (8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<220>

145

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<221> misc_feature
<222> (11) (11)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

Leu Xaa Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 27

Cys Gly Gly Gly Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<223> ARTIFICIAL

<400> ~~28~~ =

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10 15

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<223> ARTIFICIAL

<400> 29

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10 15

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 30

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

Leu

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2

<400> 31

Cys Gly Xaa Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> ~~misc_feature~~
<222> ~~(13) (13)~~
<223> Xaa at position 13 is defined as MePhe

<220>
<221> misc_feature
<222> (15) (15)
<223> Xaa at position 15 is defined as D-Beta-Nal

<400> 32

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Leu Leu Arg Pro Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5 10 15

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (11) (11)
<223> Xaa at position 11 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa at position 13 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<222> (15) (15)
<223> Xaa at position 15 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (16) (16)
<223> Xaa at position 16 is defined as Cpg

<400> 33

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

<210> 34
<211> 18
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (12) (12)
<223> Xaa at position 12 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (14) (14)
<223> Xaa at position 14 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (15) (15)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (16) (16)
<223> Xaa at position 16 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (17) (17)
<223> Xaa at position 17 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (18) (18)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 34

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

Xaa Xaa

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) (1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11) (11)
 <223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12) (12)
 <223> xaa at position 12 is defined as Hyp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13) (13)
 <223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14) (14)
 <223> xaa at position 14 is defined as Cpg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15) (15)
 <223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16) (16)
 <223> xaa at position 16 is defined as Dtlc

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17) (17)
 <223> xaa at position 17 is defined as Cpg

<400> 35

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

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) (5)
 <223> xaa at position 5 is defined as Hyp

149

A-836B PCT SEQ ST25 txt

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 36
Lys Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1          5          10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature

```

150

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<222> (11) (11)

<223> Xaa at position 11 is defined as Cpg

<400> 37

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

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 38

Cys Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
 1 5 10

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as DOrn

<220>

<221> misc_feature

<222> (11) (11)

<223> Xaa at position 11 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (13) (13)

<223> Xaa at position 13 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (15) (15)

<223> Xaa at position 15 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (16) (16)

<223> Xaa at position 16 is defined as Cpg

<400> 39

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

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

A-8368 PCT SEQ ST25 txt

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Dorn

<220>
<221> misc_feature
<222> (11) (11)
<223> Xaa at position 11 is defined as Thz

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa at position 13 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (15) (15)
<223> Xaa at position 15 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (16) (16)
<223> Xaa at position 16 is defined as Cpg

<400> 40

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

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Dorn

<220>
<221> misc_feature
<222> (11) (11)
<223> Xaa at position 11 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa at position 14 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (15) (15)
<223> Xaa at position 15 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (16) (16)
<223> Xaa at position 16 is defined as Cpg

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<400> 41

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

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 42

Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10 15

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (1)

<223> Xaa at position 1 is defined as D-Dab

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) (5)

<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 43

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

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) (1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa at position 1 is defined as D-Dab

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) (5)
 <223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) (7)
 <223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) (9)
 <223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10) (10)
 <223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

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

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa at position 1 is defined as Dorn

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) (5)
 <223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) (7)
 <223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) (9)
 <223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

159

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 45

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DOrn

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 46

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as D-3'Pal

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 47

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ~~ARTIFICIAL PEPTIDE~~

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as D-3'Pal

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as cpg

<400> 48

A-836B PCT SEQ ST25 txt

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as D-Lys

<220>
<221> misc_feature
<222> (2) (2)
<223> Xaa at position 2 is defined as D-2-Nal

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 49

Xaa Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (2) (2)
<223> Xaa at position 2 is defined as D-2-Nal

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

A-8368 PCT SEQ ST25 txt

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 50

Leu Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> ~~Xaa at position 1 is defined as Dorn~~

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-NaI

<400> 51

Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)

158

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<223> ACETYLATION

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (1)

<223> Xaa at position 1 is defined as DOrn

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) (3)

<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>

<221> misc_feature

<222> (6) (6)

<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>

<221> misc_feature

<222> (8) (8)

<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-NaI

<400> 52

Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

1

5

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (1)

<223> Xaa at position 1 is defined as DOrn

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) (4)

<223> Xaa at position 4 is defined as Oic

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Me-Phe

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as D-Beta-NaI

<400> 53

Xaa Leu Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

1

5

10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) (1)

<223> ACETYLATION

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (1)

<223> Xaa at position 1 is defined as DOrn

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) (4)

<223> Xaa at position 4 is defined as Oic

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Me-Phe

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as D-Beta-NaI

<400> 54

Xaa Leu Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5 10

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (8) (8)

<223> Xaa at position 8 is defined as Me-Phe

<400> 55

Leu Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile
1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) (1)

<223> ACETYLATION

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-NaI
<400> 56

Leu Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Orn

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-NaI
<400> 57

Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Orn

<220>
<221> misc_feature

(6)

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-Nal

<400> 58

Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-Nal

<400> 59

Leu Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) (6)
 <223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8) (8)
 <223> Xaa at position 8 is defined as p-Beta-NaI

 <400> 60

Leu Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
 1 5

ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR B1 DE BRADIQUININA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional No 60/513,913 presentada en Octubre 22, de 2003, y la solicitud provisional No 60/538,929 presentado en Enero 24, de 2004, que se incorpora aquí como referencia

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Más de dos millones de personas solo en los Estados Unidos están incapacitadas por dolor crónico en un día cualquiera (T M Jessell & D D Kelly, Pain and Analgesia in PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE, Third edition (E R Kandel, J H Schwartz, T M Jessell, ed , (1991)) Desafortunadamente, los tratamientos habituales para el dolor son sólo parcialmente efectivos, y muchos causan también alteración del estilo de vida, debilitamiento y/o peligrosos efectos colaterales Por ejemplo, las drogas anti-inflamatorias no esteroides ("NSAID") tales como la aspirina, el ibuprofeno, y la endometacina son moderadamente efectivas contra el dolor inflamatorio pero ellas también son renalmente tóxicas, y altas dosis tienden a originar irritación gastrointestinal, ulceración, sangrado, incremento de riesgo cardiovascular, y confusión Los pacientes tratados con opioides frecuentemente experimentan confusión y constipación, y el uso a largo plazo de opioides está asociado con tolerancia y dependencia Los anestésicos locales tales como la lidocaina y la mixelina inhiben simultáneamente el dolor y originan pérdida de la sensación normal Además, cuando se utiliza anestésicos sistémicamente locales están asociados con efectos cardiovasculares adversos Así, subsiste la necesidad insatisfecha del tratamiento del dolor crónico

El dolor es una percepción basada en las señales del ambiente y transmitidas e interpretadas por el sistema nervioso (for review, see Millan, M. J., The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164 (1999)). Los estímulos nocivos tales como el calor y aguijoneo hacen que los receptores sensoriales especializados de la piel envíen señales al sistema nervioso central ("CNS"). Este proceso es denominado nocicepción, y las neuronas sensoriales periféricas que lo miden son los nociceptores. Dependiendo de la fuerza de la señal proveniente del o los nociceptores y la abstracción y elaboración de esa señal por el CNS, una persona puede o no experimentar un estímulo nocivo como doloroso. Cuando la percepción de alguien es dolorosa, esta adecuadamente calibrada con la intensidad del estímulo, el dolor sirve para su función protectora pretendida. Sin embargo, ciertos tipos de daño de tejido originan un fenómeno, conocido como hiperalgesia o pronocicepción, en la cual estímulos relativamente inocuos son recibidos como intensamente dolorosos porque el umbral de dolor de la persona se ha disminuido. Tanto la inflamación como el daño nervioso pueden inducir hiperalgesia. Así, las personas afligidas con condiciones inflamatorias, tales como quemaduras de sol, osteoartritis, colitis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad vascular de colágeno (que incluye artritis reumatoide y lupus) y similares, a menudo experimentan sensaciones mejoradas de dolor. Similarmente, el trauma, la cirugía, la amputación, el absceso, la causaigia, la enfermedad vascular del colágeno, las enfermedades desmielinizantes, la neuralgia trigeminal, el cáncer, el alcoholismo crónico, apoplejía, síndrome de dolor talámico, diabetes, infecciones por herpes, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, ("SIDA"), toxinas y daños nerviosos causados por quimioterapia que dan como resultado dolor excesivo.

Como los mecanismos de los cuales los nociceptores traslucen señales externas bajo condiciones normales e hiperalgésicas se han entendido mejor, los procesos implicados en la hiperalgesia, pueden ser señalados por inhibir la disminución del umbral de dolor y disminuir de esta manera la cantidad de dolor experimentado

La bradiquinina (BK) y el tosido relacionado, canidina (Lys-BK) (ver tabla) median las acciones fisiológicas de las quininas sobre los sistemas cardiovascular y renal. Sin embargo, los péptidos activos, Bk y canidina, son rápidamente degradados por las peptidasas en el plasma y otros fluidos biológicos y por aquellos liberados de una variedad de células, de tal forma que la vida media del BK en el plasma se reporta por aproximadamente 17 segundos (1). El BK y la canidina son rápidamente metabolizados en el cuerpo por carboxipeptidasa N, que remueve el residuo de arginina carboxiterminal para generar des-Arg-BK o des-Arg canidina. La des-Arg-canidina está entre las quininas predominantes en el hombre y median las acciones fisiológicas de las quininas en el hombre. Además de iniciar un péptido proinflamatorio muy potente, la des-Arg-BK o des-Arg-canidina es conocida por inducir vaso dilatación, permeabilidad vascular, y broncoconstricción, (para revisión ver Regoli y Barabe, Pharmacology of Bradykinin and Related Kinins, Pharmacological Reviews, 32(1) 1-46 (1980)). Además, las des-Arg-BK o des-Arg-canidina parecen mediadores particularmente importantes de la inflamación y el dolor inflamatorio así como también estar involucrados en el mantenimiento de estos. Existe también un cuerpo considerable de evidencia que implica la sobre producción de des-Arg-canidina en condiciones en las cuales el dolor es una característica prominente tal como el choque séptico, la artritis, la angina, y la migraña.

Los receptores de membrana que median las acciones pleiotrópicas de las quininas son de dos distintas clases, designadas B1 y B2. Ambas clases de receptores se han clonado y secuenciado de una variedad de especies, que incluyen el hombre (Menke, et al, Expression Cloning of a human b1 bradykinin receptor J Biol Chem 269 21583-21586 (1994)), Hess et al, Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor Biochem Biophys Res Commun 184, 260-268 (1992)). Ellos son receptores típicos acoplados a proteína G que tienen siete regiones que se extienden sobre la membrana putativa. En varios tejidos, los receptores BK están acoplados a cada segundo mensajero conocido. Los receptores B2, que tienen una agilidad mayor por el BK, parecen ser la forma más prevalente de receptor de bradiquinina. Esencialmente todas las respuestas fisiológicas normales y muchas respuestas patológicas a la bradiquinina son mediados por los receptores B2.

Receptores B1, de otra parte, tienen una mayor afinidad con el des-Arg-BK (ver tabla 3) comparados con el BK, mientras que el des-Arg-BK es inactivo a los receptores B2. Además, los receptores B1 no son expresados normalmente en la mayoría de los tejidos. Su expresión es inducida luego de lesión o daño de tejido así como también en ciertas clases de inflamación crónica o lesión sistémica (Marceau, F, et al, Kinin B1 receptors: a review Immunopharmacology, 30 1-26 (1995)). Adicionalmente, las respuestas mediadas por los receptores B1 son sobre reguladas de un nivel nulo luego de la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS) o citocinas inflamatorias en conejos, ratas, cerdos (Marceau et al, (1998)).

Las propiedades que inducen el dolor de las quininas acopladas con la expresión inducible de los receptores B1 hacen del receptor B1 un blanco interesante en el desarrollo de agentes inflamatorios, antinociceptivos,

antihiperalgésicos, y analgésicos que puedan ser dirigidos específicamente a tejidos dañados con acciones mínimas en los tejidos normales. Aunque una variedad de antagonistas péptidos que apuntan al receptor B1 han sido identificados, su desarrollo como analgésicos terapéuticos han sido obstaculizados por las vidas medias eficaces pobres que resultan de la degradación muy rápida del tejido y las serum peptidasas y la limpieza renal eficiente. Más recientemente, los análogos de péptido que tienen sustituyente de aminoácido no naturales han mostrado ser resistentes a las peptidasas en ensayos de estabilidad in Vitro (para revisión ver, Regoli et al, Bradykinin receptors and their antagonists *European Journal of Pharmacology*, 348 1-10 (1998), Stewart, J M , et AL, Bradykinin antagonists present progress and future prospects *Immunopharmacology*, 43 155-161 (1999), and Stewart, J M , et al , Metabolism- Resistant Bradykinin Antagonists Development and Applications *Biol Chem* , 382 37-41 (2001))

La conjugación covalente de las proteínas con poli (etilenglicol) (PEG) han sido reconocidas ampliamente como una aproximación para extender significativamente las vidas medias circulantes in vivo de las proteínas terapéuticas. La PEGilación logra este efecto predominantemente al retardar la limpieza renal, en razón a que las porciones PEG ayudan y agregan radio hidrodinámico considerable a la proteína (Zalipsky, S , et al , Use of Functionalized poly (ethylene glycol) s for modification of polypeptides , in *Poly (ethylene glycol) chemistry Biotechnical and biomedical applications* , J M Hams, Editor (1992), Plenum Press New York P 347-370) Los beneficios adicionales a menudo conferidos por la PEGilación de proteínas incluyen solubilidad incrementada, resistencia a degradación proteolítica, e inmunogenicidad reducida del polipéptido terapéutico. Los méritos de la PEGilación de proteína se evidencian por la comercialización de varias proteínas PEGiladas que incluyen PEG- adenosin

desaminasa (AdagenTM / Enzon Corp), PEG -L- asparaginasa (OncasparTM Enzon Corp), PEG-interferón α -2b (PEG-IntronTM Schering/ Enzon), PEG-interferon α -2a (PEGASYSTM Roche) y PEG-G-CSF (NeulastaTM / Amgen) así como también muchos otros en ensayos clínicos La PEGilación de péptidos terapéuticos pequeño, de otra parte, presenta retos únicos y no ha sido ampliamente aplicada Uno de los mayores obstáculos a la PEGilación de péptido es el requisito esencial de que la actividad biológica sea preservada en el conjugado final En razón a que los péptidos terapéuticos a menudo comprenden la secuencia mínima requerida para la actividad y son por lo tanto muy pequeños, ellos son relativamente intolerantes a la sustitución En razón a que los péptidos terapéuticos comprenden a menudo la secuencia mínima requerida para la actividad y son por lo tanto muy pequeñas, ellas son relativamente intolerantes a la sustitución Las porciones PEG son desproporcionadamente más largas que los péptidos mismos y consecuentemente interfieren más probablemente estérnicamente con las interacciones de unión péptido receptor específicas requeridas para la actividad Así, la capacidad del péptido a tolerar la PEGilación y a un retener suficiente actividad específica para ser un terapéutico útil es muy impredecible y debe ser determinada empíricamente (Morpurogo, et al , Selective Alkylation and Acylation of α and ϵ Amino Groups with PEG in a Somatostatin Analogue Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates Bioconjugate Chem 13 1238-1243 (2002))

Claramente, existe necesidad de tratamientos nuevos, seguros y efectivos para la inflamación y el dolor Sería una ventaja tener un antagonista péptido específico B1 que sea más capaz de tolerar la exposición sistémica durante el tratamiento, al mejorar la vida circulante (limpieza de morada), solubilidad, estabilidad, y/o disminución de la inmunogenicidad de la molécula La vida

circulante incrementada daría como resultado un régimen de dosificación menos frecuente y un programa de dosificación menos frecuente sería más conveniente tanto para médicos como para pacientes, y sería particularmente de ayuda para aquellos pacientes involucrados en la auto administración. Otras ventajas de dosificación menos frecuente pueden incluir que sean introducidas menos drogas en los pacientes con un mayor cumplimiento.

RESUMEN DE LA INVENCION

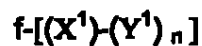
De acuerdo con esto, es un objeto de la presente invención suministrar agentes de unión novedosos del receptor B1 con propiedades farmacocinéticas demostrablemente superiores in vivo comparados con los antagonistas B1 de péptido conocido a un antagonismo suficiente de la actividad del receptor B1 de tal forma que ellos sean terapéuticamente útiles en el tratamiento o prevención de inflamación, dolor, y otras condiciones mediadas por B1 que incluyen, pero no están limitadas a, asma y rinitis alérgica. Tales agentes se suministran por la presente invención en la forma de antagonistas de péptido y antagonistas de péptido conjugados del receptor B1. En una modalidad, los antagonistas de péptido novedosos receptores B1 de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácido como se muestra en una cualquiera de las secuencias ID de SEC Nos 15-54.

De acuerdo con algunas modalidades de esta invención, una o mas, y preferiblemente entre uno y nueve residuos de aminoácido, independientemente seleccionados de cualquiera de los veinte L-aminoácidos genéticamente codificados o los D-aminoácidos estereoisoméricos, estarán acoplados a cualquiera

o a ambos extremos de las secuencias de péptido como se muestra en la ID de SEC No 15-54

En otra modalidad, la presente invención también suministra péptidos conjugados que tienen propiedades farmacocinéticas demostrablemente superiores in vivo comparadas con los antagonistas conocidos B1 de péptido aún ellos se unen suficientemente y antagonizan la actividad del receptor B1 de tal forma que ellos pueden ser utilizados terapéuticamente

Un aspecto de la invención comprende un péptido conjugado de la fórmula



|

En donde

F es un vehículo covalentemente unido a X^1 o Y^1 (Preferiblemente F es una porción PEG o un derivado de esto), a X^1 y Y^1 son independientemente en cada instancia péptidos de la fórmula $-L^1 - P^1$ y $-L^2 - P^2$, respectivamente,

L^1 y L^2 son independientemente en cada instancia ligadores,

n es 0 a 3, y

P^1 y P^2 son independientemente en cada instancia ligadores, antagonistas de péptido del receptor B1 de bradiquinina Preferiblemente, P^1 y P^2 comprenden una secuencia de aminoácido como se muestra en una cualquiera de las ID de SEC No 5-26, 43-60, y derivados de estos

Otro objeto de la presente invención es suministrar una composición farmacéutica que comprenda materiales corporales excipientes que tienen un péptido conjugado de la invención y expresado en el

Otro objeto de la presente invención es suministrar métodos terapéuticos que comprendan la administración a un mamífero necesitado de ello de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición que comprende excipientes al menos un péptido y/o péptido conjugado de la invención

Los péptidos y/o los péptidos conjugados de la invención tienen valor terapéutico para el tratamiento de enfermedades mediadas por la activación B1, influyendo, pero no limitado a, estados de inflamación y de dolor crónico de origen inflamatorio neuropático, choque séptico, artritis, osteoartritis, angina, asma, rinitis alérgica y migraña

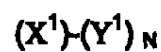
Los péptidos y/o los péptidos conjugados de la invención se pueden utilizar para propósitos terapéuticos o profilácticos al formularlos con materiales portadores farmacéuticos apropiados y administrar una cantidad efectiva a un paciente, tal como un humano (u otro mamífero) necesitado de ello

Los péptidos útiles adicionales y/o los péptidos conjugados pueden resultar de modificaciones conservadoras de las secuencias de aminoácido de los péptidos y/o los péptidos conjugados al vehículo descritos aquí. Las modificaciones conservadoras producirán péptidos y/o péptidos conjugados que tengan características funcionales, químicas y físicas similares a aquellos de los péptidos y/o el péptido conjugado del cual son hechas tales modificaciones. Tales

formas considerablemente modificadas de los péptidos y/o péptidos conjugados descritos aquí también son contemplados por ser una modalidad de la presente invención

Otro objeto de la invención relaciona con un método para elaborar un péptido conjugado como se describe aquí, que comprende las etapas de

Hacer reaccionar un compuesto que la estructura



En donde

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

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

N es 0 a 3, y

P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor B1 de bradiquinina,

Con un vehículo, (F) para dar un péptido conjugado de la fórmula $F-[(X^1)]$, $f-[(X^1)]-f$, $f-[(X^1)-(Y^1)_N]$, $f-(X^1)-(Y^1)_N$ o $f-(X^1)-(Y^1)_N-F$ Preferiblemente F es la porción PEG a un derivado de estos. Más preferiblemente, P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor B1 de

bradiquinina que comprende al menos una de las secuencias de péptido mostradas en la ID de SEC No 5-60. Aun más preferiblemente X¹ es un péptido como se muestra en la ID de SEC No 27-41. Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes luego de la consideración de la decisión detallada de la invención que sigue.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está basada en el hallazgo sorprendente de que una clase de péptidos generalmente considerada por ser muy intolerante a la sustitución pueden ser aminoácidos sustituidos en el terminal N y/o conjugados a varios vehículos en el terminal N para suministrar péptidos terapéuticamente útiles y/o conjugados de péptido con perfiles de eficacia dramáticamente sostenida comparados con los péptidos conocidos de la misma clase y por lo tanto ellos permiten su uso para manejar la inflamación y el dolor. Así, los péptidos y/o conjugados de péptido de la presente invención suministran tremenda ventaja terapéutica sobre los antagonistas de péptido B1 conocidos. Más particularmente los inventores han encontrado que los inconvenientes previamente descritos en los antagonistas de péptido B1 conocidos con respecto a su uso terapéutico son sobrepasables al sustituir los aminoácidos en el terminal N y/o conjugar los antagonistas de péptido a vehículos tales como, pero no limitados a, moléculas de polietilenglicol (PEG) que utilizan ligadores peptídil o no peptídil de tamaño y composición definidas que maximizan la preservación de la actividad del antagonista y la especificidad aunque prolongando la vida media eficaz in vivo. Adicionalmente (o alternativamente), se descubrió que a pesar de la actividad ligeramente reducida in Vitro concedida a los antagonistas de péptido B1 conjugados a polímeros PEG más largos las vías medias circulantes extendidas

de los conjugados PEG largos suministran exposición significativamente mayor y eficacia prolongada in vivo comparados con los conjugados de péptido conjugados a polímeros PEG más pequeños. Además, los presentes inventores han encontrado que el tamaño de la molécula PEG unida a un antagonista de péptido del receptor B1 es un parámetro crítico para optimizar la actividad antagonista intrínseca y la vida media eficaz in vivo. Por ejemplo, un antagonista B1 de péptido acetilado demostró eficacia en modelos relevantes in vivo de dolor durante un máximo de cuatro horas luego de dosificación múltiple. Sorprendentemente, el mismo péptido conjugado a una molécula de 5 KD y de 20 KD de la manera descrita aquí demostró eficacia durante hasta dos días y durante al menos cuatro días, respectivamente, después de una inyección de bolo simple.

Antes de que los péptidos y los antagonistas de péptido conjugados a vehículo o a PEG del receptor B1 de bradiquinina de la presente invención y los métodos para elaborar tal se han descrito, se debe entender que esta invención está limitada a los péptidos particulares y/o y los antagonistas de péptido conjugado descritos, en razón a que los péptidos y/o los antagonistas de péptido conjugados y las metodologías contempladas por la presente invención pueden, por supuesto, variar ligeramente. Se debe entender que la tecnología utilizada aquí es con el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretenden ser limitantes en razón a que el alcance de la presente invención será limitado solamente por las reivindicaciones finales.

Los péptidos de unión del receptor B1 de bradiquinina contemplados para la conjugación a un vehículo para los propósitos y de la manera descritos aquí incluyen, pero no están limitados a, antagonistas de péptido B1 novedosos descritos aquí así como también antagonistas de péptido de unión B1 conocidos.

en la técnica que incluyen, pero no están limitados, a cualquier péptido descrito en una cualquiera de las siguientes publicaciones (cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad) Regoli et al , Bradykinin receptors and their antagonists Eur J of Pharma , 348 1-10 (1998), Neugebauer, W , et al , Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties Can J Physiol Pharmacol , 80 287-292 (2002), Stewart , et al, Bradykinin antagonists present progress and future prospects Immunopharmacology, 43 155-161 (1999), Stewart, J M, et al , Metabolism-Resistant Bradykinin Antagonists Development and Applications Biol Chem , 382 37-41 (2001) PCT Publication WO 98/07746, and U S Patent Nos 4,693,993, 4,801,613, 4,923,963, 5,648,336, 5,834,431, 5,849,863, 5,935,932, 5,648,333, 5,385,889, 5,444,048, y 5,541,286

Los términos utilizados a lo largo de esta especificación se definen como siguen, a menos que se limiten de otra forma en casos específicos

Los residuos de aminoácido natural se discuten de tres maneras nombre completo del aminoácido, código estándar de tres letras, o código estándar de una letra de acuerdo con la siguiente tabla

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

A menos que claramente se indique otra cosa, una designación aquí de un aminoácido natural o no natural está destinada a comprender tanto en isómero D- y L- del aminoácido. Las abreviaturas utilizadas aquí para aminoácidos no naturales son las mismas descritas en la patente U S No 5,834,431, publicación PCT WO 98/07746, y Neugebauer, et al (200), cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Adicionalmente, las abreviaturas "Dab" y "D-dab" están destinadas a referirse al isómero L- y D- del aminoácido no natural, del ácido D-2 aminocitico, respectivamente. La abreviatura "3'Pal" y "D-3 Pal" está destinada a referirse al isómero L- y D- del aminoácido natural 3'-indilalanina respectivamente. También, la abreviatura "lg1" está destinada a incluir también "lg1a" y "lg1b" (α -(1-indany1) glicina y α -(2-indany1) glicina, respectivamente). De manera similar, "Dlg1" está destinado tanto a incluir "d-lg1a" como "D-lg1b" (los D- isómeros de α -(1-indany1) glicina y la α -(2-indany1) glicina, respectivamente). Preferiblemente, cuando se utilizan aquí, lg1 e lg1b y D-lg1 e D-lg1b.

Por "péptido conjugado vehículo" o "péptido conjugado" se significa un compuesto que tiene actividad biológica y que cuando se administra a un mamífero suministra un efecto terapéutico. Las dos partes incluyen (1) al menos un péptido B1 antagonista y (2) al menos un vehículo como se definió anteriormente covalentemente unido a un residuo del péptido mismo o a un ligador peptídico y no peptídico (que incluye pero no está limitado a ligadores aromáticos) que está covalentemente unido a un residuo del péptido.

Por "péptido conjugado PEG" o "péptido PEGilado" se significa un compuesto de dos partes que tiene actividad biológica y que cuando se administra a un mamífero suministra un efecto terapéutico. Las dos partes incluyen (1) al

menos un antagonista péptido B1 Y (2) al menos una porción de polietilenglicol (PEG) covalentemente unida a un residuo del péptido mismo o a un ligador peptídico o no peptídico (que influye pero no está limitado a ligadores aromáticos) que está covalentemente unido a un residuo del péptido

Por "polietilenglicol" o "PEG" se significa un compuesto de polialquilenglicol o un derivado de estos, con o sin agentes de acoplamiento o derivatización con porciones de acoplamiento o activación (con porción tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, ortopindil disulfuro, vinilsulfona, yodo acetamida o maleimida)

El PEG es un polímero soluble en agua bien conocido que está comercialmente disponible o se puede preparar mediante polimerización de anillo abierto de etilenglicol de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academia Press, New York, Vol 3, páginas 138-161) En la presente solicitud, el término de "PEG" se utiliza ampliamente para comprender cualquier molécula de polietilenglicol, en forma mono poli funcional, sin considerar el tamaño o la modificación en un extremo del PEG y se puede representar por la fórmula



Donde n es 20 a 2300 y X es H o una modificación terminal, por ejemplo, un alquilo C₁₋₄

Preferiblemente, el PEG utilizado en la invención termina sobre un extremo sin hidroxilo o metoxi, es decir, X es H o CH₃ ("metoxi PEG") Se nota que cuando x= CH₃ en otro extremo del PEG, es mostrado en la fórmula II termina en OH, se

une covalentemente a una porción activante por vía de una unión del oxígeno del éter. Cuando $X=H$ ambos extremos del PEG están unidos a porciones activantes por vía de uniones de éter dando origen PEGS bis-funcionalizados lineales. Cuando se utilizan en una estructura química como el término "PEG" incluye la fórmula II anterior sin el hidrógeno del grupo hidroxilo mostrado, dejando el oxígeno disponible para reaccionar con un átomo de carbono libre de un ligador para formar una unión éter. Más específicamente, con el fin de conjugar el PEG a un péptido, el PEG debe estar en una forma "activada". El PEG activado se puede representar mediante la fórmula III



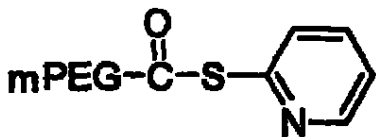
III

Donde el PEG (definido supra) se une covalentemente a un átomo de carbono de la porción de activación (A) para formar una unión éter, y (A) contiene un grupo reactivo que pueda reaccionar con un grupo amino, imino, o tiol sobre un residuo de aminoácido de un péptido o una porción ligadora covalentemente unida al péptido.

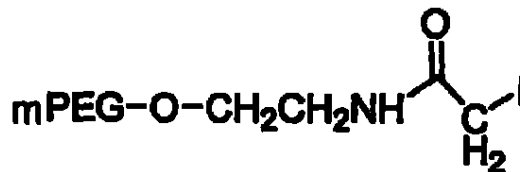
Los métodos para la preparación de los PEG activados son bien conocidos en la técnica, como por ejemplo, ver patente número 5,643,575, 5,919,455, 5,932,462, y la publicación PCT WO 95-06058 (cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad). Los PEG activados adecuados se pueden producir mediante un número de reacciones convencionales. Por ejemplo, un éster de N-hidrosuccinimida de un PEG (M-NHS-PEG) se pueden preparar de PEG -- monometil éter (que está comercialmente disponible de Union Carbide) mediante la reacción con N,N'-dixiclorocarbodimida (DCC) y N-hidrosuccinimida (NHS), de acuerdo con el método de Buckmann y Merr, Makromol Chem, 182

1379-1384 (1981) Otros PEGS activados, tales como Peg aldehídos, se pueden obtener de una fuente comercial, por ejemplo, Nektar Therapeutics (Huntsville, A1) o Enzon, INC (Piscataway, N J) Ejemplos de PEG activados preferidos para los propósitos de la presente invención son PEG-propionaldehído y PEG-butiraldehído que están comercialmente disponibles de Néctar Therapeutics (Huntsville, A1) EL PEG propionaldehído se representa por la fórmula PEG- CH₂CH₂CHO y se describe en la patente numero 5,252,714, que se incorpora completamente como referencia aquí Además, los aldehídos PEG bifuncionales se pueden utilizar para preparar conjugados diméricos

Los PEG reactivos a amina adicionales preferidos incluyen metoxi-PEG succinimidil propionato (MPEG-SPA) y metoxi -PEG succinimido butanoato (MPEG-SBA), MPEG- benzotriazol carbonato o MPEG -p-nitrofenil carbonato que están disponibles en una variedad de pesos molecular de Nektar Therapeutic (Huntsville, A1), Enzon, INC (Piscataway, N J), o NOF Corporation (Tokio, Japón) Las porciones PEG activadas preferidas adicionales incluyen funcionalidades reactivas tiol que incluyen, pero no están limitadas a, PEG vinil sulfonas, representadas por la fórmula PEG- CH₂ CH₂SO₂ CH = CH₂, MPEG -yodoacetato y MPEG- tioésteres descritos adelante



mPEG-tioéster

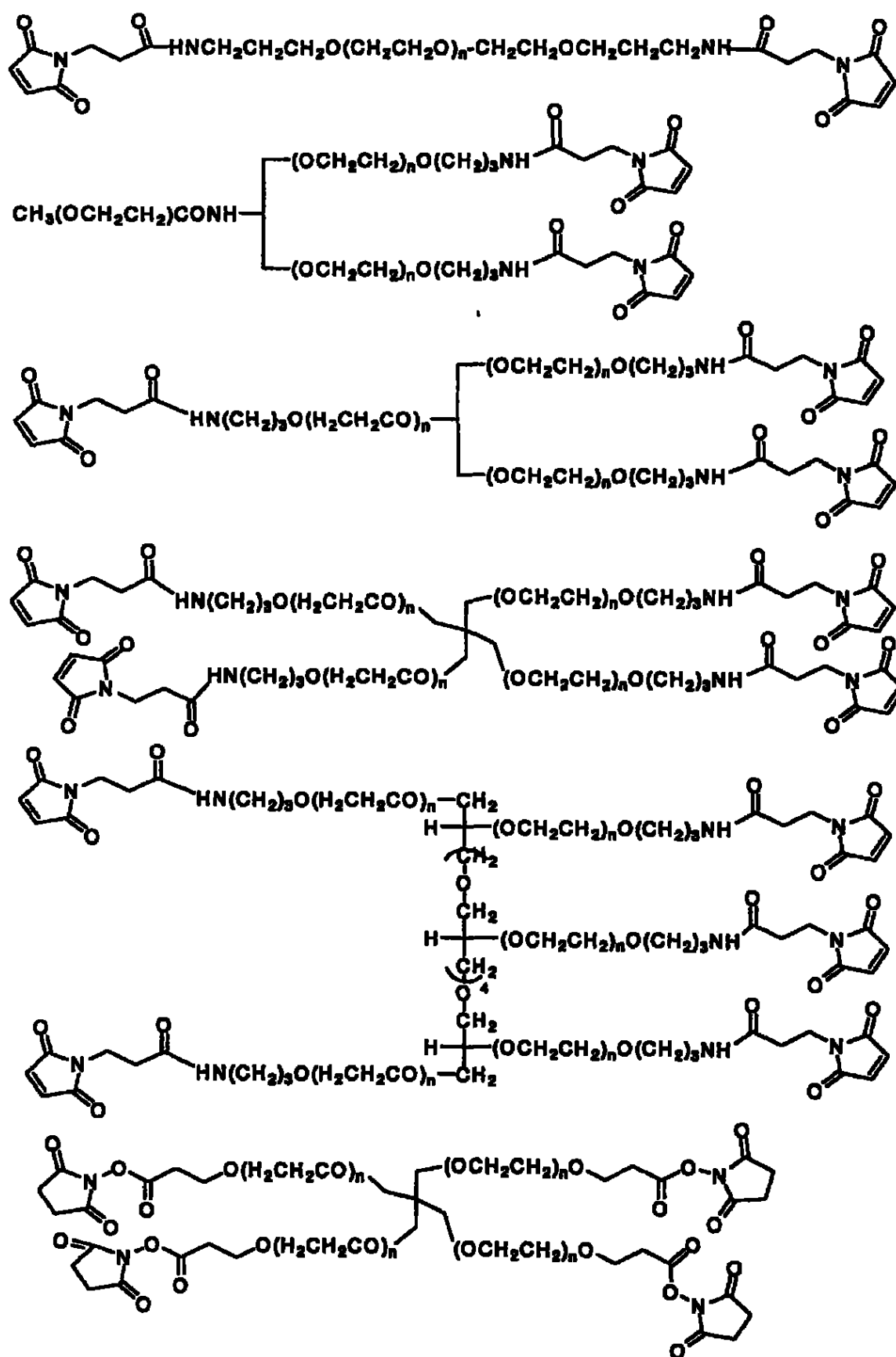


mPEG-yodoacetamida

Otro PEG activado prefendo para generar los péptidos conjugados a PEG de la presente invención es la PEG- maleimida. Los compuestos tales como maleimido monometoxi PEG son particularmente útiles para generar los péptidos conjugados a PEG de la invención.

Un PEG activado aún más prefendo para generar los péptidos conjugados a PEG de la presente invención son los PEG multivalentes que tienen más de un residuo activado.

Las porciones PEG multivalentes prefendas incluyen, pero no están limitadas a aquellas mostradas adelante.



Cualquier masa molecular para un PEG se puede utilizar como prácticamente se desee como por ejemplo, aproximadamente 1000 daltons (DA) A 100 000 DA (n es 20 a 2300) El número de unidades repetidas "N" es aproximado para la masa molecular descrita en Daltons Se prefiere que en la masa molecular combinada de PEG sobre un ligador activado sea adecuado para uso farmacéutico Así, la masa molecular combinada de las moléculas PEG no debe exceder 100 000 Da

Preferiblemente, la masa molecular combinada o total del PEG utilizado en un péptido conjugado PEG de la presente invención va desde aproximadamente 3 000 Da a 60 000 Da (total n es de 70 a 1400), más preferiblemente desde aproximadamente 8 800 Da a 36 000 Da (total n es aproximadamente 200 a 820) La masa combinada más preferenda para PEG va desde 20 000 Da a 24 000 Da (total n es aproximadamente 450 a 540)

Otros compuestos de polialquilenglicol, tales como propilenglicol, se pueden utilizar en la presente invención Otros compuestos de polienglicol apropiados incluyen, pero no están limitados a polímeros cargados o neutros de los siguientes tipos dextran, ácidos colomínicos u otros polímeros basados en carbohidrato, polímeros de aminoácidos y derivados de biotina

El término "comprende" significa que un péptido o un péptido conjugado pueden incluir entidades moleculares adicionales, que incluyen, pero no están limitadas a, aminoácidos, sobre cualquiera o ambos de los terminales N- o C- de la secuencia dada Por supuesto, estas entidades moleculares adicionales no deben interferir significativamente con la actividad del péptido o el péptido conjugado

Como se utilizan aquí, el término "péptido nativo" se refiere a un antagonista de péptido B1 no conjugados descrito aquí o conocido en la técnica

Los términos "derivatizante" y "derivado" o "denvar" comprende procesos y los péptidos resultantes o péptidos conjugados, respectivamente, en los cuales (1) el péptido o péptido conjugado tiene una porción cíclica, por ejemplo, reticulación entre residuos de cisteína dentro del péptido conjugado, (2) el péptido o péptido conjugado es reticulado o tiene un sitio de reticulación, por ejemplo, el péptido o péptido conjugado tiene un residuo cisteína y forman así dímeros reticulados en cultivo o in vivo, (3) el N-Terminal de un péptido conjugado que tiene un grupo terminal $-NH_2$ es reemplazado por $-NRR^1$, $NRC(O)R^1$, $NRC(O)R^1$, $-NRS(O)_2R^1$, $-NHC(O)NHR$, o un grupo succinimida, o benziloxycarbonilo-NH- sustituido o no sustituido, en donde R y R^1 y el anillo constituyente define posteriormente, (5) el terminal c se reemplaza por $-C(O)R^2$ o $-NR^3R^4$ en donde R^2 , R^3 y R^4 se definen posteriormente, y (6) los péptidos conjugados en los cuales las funciones de aminoácido individuales se modifican a través de tratamiento con agentes capaces de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. Los derivados son además descritos posteriormente.

El término "B1" significa el receptor B1 de bradiquinina (ver, Judith M Hall, A review of BK receptors Pharmac Ther 56 131-190 (1992)) A menos que específicamente se anote otra cosa, el receptor B1 de bradiquinina está destinado a significar el receptor B1 de bradiquinina humano (hB1). Preferiblemente, el hB1 es el receptor tipo silvestre. Más preferiblemente, el hB1 es el receptor de bradiquinina descrito en el número de acceso del genbank AJ 238044.

El término "péptido" se utiliza de manera general aquí se refiere a moléculas de 4 a 40 aminoácidos, con moléculas de 10 a 20 aminoácidos siendo más preferidas y aquellas de 15 a 18 aminoácidos siendo más preferidas. El término "dipéptido" como se utiliza aquí se refiere a una molécula de dos aminoácidos. El término "tripéptido" como se utiliza aquí se refiere a una molécula de tres aminoácidos.

El análisis estructural de la interacción proteína-proteína también se puede utilizar para sugerir péptidos que semejen la actividad de unión de ligandos de proteína largos. En tales análisis la estructura del cristal puede sugerir la identidad y la orientación relativa de los residuos del cristal desligando de proteína del cual pueden ser designados los péptidos análogos. Ver, por ejemplo, Takasaki et al., Nature Biotech., Volume 15, pages 1266-1270 (1997). Estos métodos analíticos también se pueden utilizar para investigar la interacción entre una proteína receptora y un péptido, el péptido conjugado a vehículo, o el péptido conjugado PEG de la presente invención, que puede sugerir modificación adicional del péptido o los conjugados de péptido para incrementar la afinidad de unión.

Como se utilizan aquí "cantidad efectiva" y "cantidad terapéuticamente efectiva" cuando se utilizan con referencia a un péptido, péptido conjugado a vehículo, o antagonista B1 de péptido pre conjugado PEG se refieren a una cantidad o dosis suficiente para producir un resultado deseado (es decir, para terapia con los péptidos, péptidos conjugados a vehículo, y/o antagonistas B1 de péptido conjugado a PEG de la presente invención). En el contexto de la presente invención, el resultado deseado es una reducción deseada de la inflamación y/o dolor, por ejemplo, o para soportar una disminución observable en el nivel de una o más actividades biológicas del B1. Más específicamente, una cantidad

terapéuticamente efectiva es una cantidad del péptido y/o el péptido conjugado suficiente para inhibir, durante algún periodo de tiempo uno o más de los procesos patológicos clínicamente definidos asociados con la condición en el tejido como por ejemplo, inflamación o dolor en un sujeto tratado in vivo con el o los agentes. La cantidad efectiva puede variar dependiendo del péptido específico y/o el antagonista B1 de péptido conjugado seleccionado, y también es dependiente de una variedad de condiciones y factores relacionados con el sujeto a ser tratado y la severidad del desorden. Por ejemplo, si el péptido y/o el antagonista B1 de péptido conjugado va a ser administrado in vivo, factores tales como la edad, peso y salud del paciente así como también las curvas de respuesta de la dosis y los datos de toxicidad obtenidos en trabajo pre clínico con animales estarían entre aquellos considerados. Si el o los agentes van a ser contactados con las células in Vitro, designaría también una variedad de estudios pre clínicos in Vitro para evaluar tales parámetros como toma, vida media, dosis, toxicidad, etc. La determinación de una cantidad efectiva o de una cantidad terapéuticamente efectiva para un agente dado esta dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica.

El término "farmacológicamente activo" significa que una sustancia descrita así se determina por tener actividad que afecta un parámetro médico o un estado de enfermedad (por ejemplo, dolor). En el contexto de la invención este término se refiere típicamente a una enfermedad inducida por B1 o mediada por B1 o a una condición médica anormal o desorden, y más específicamente, a antagonismo de la inflamación o dolor.

Los términos "antagonista", "inhibidor" y "agonista inverso" (por ejemplo ver, Rianne A F de Lig, et al, British Journal of Pharmacology 2000, 130,131) se

refieren a una molécula que bloquea, impide, reduce, disminuye o de alguna manera interfiere con la actividad biológica de la proteína asociada de interés. Un "antagonista" o "inhibidor" preferido de la presente invención es una molécula que se une a o inhibe B1 con un IC_{50} DE 500 NM o menos en ensayos in Vitro de la actividad de B1. Un "antagonista" o "inhibidor" más preferido de la presente invención es una molécula que se une e inhibe B1 con un IC_{50} de 100 NM o menos en ensayos in Vitro de la actividad de B1. Un "antagonista" o "inhibidor" más preferido de la presente invención es una molécula que se une a e inhibe B1 un IC_{50} de 50 NM o menos en ensayos in Vitro de la actividad de B1 y mejora o elimina el dolor medido en al menos un modelo de dolor para animal in vivo generalmente aceptado y/o inhibe desafíos bioquímicos en modelos de animal in vivo de edema, inflamación, dolor.

Adicionalmente, las sales fisiológicamente aceptables de los péptidos o péptidos conjugados de la invención también están comprendidos aquí. Las frases "sales fisiológicamente aceptables" y "sales farmacológicamente aceptables" como se utilizan aquí son intercambiables y pretenden incluir cualquier sales que sean conocidas o descubiertas posteriormente y que sean farmacéuticamente aceptables (es decir útiles en el tratamiento de un animal de sangre caliente). Algunos ejemplos específicos son acetato, trifluoroacetato, hidroháluros, tal como clorhidrato o bromhidrato, sulfato, citrato, caltrato, glicolato, oxalato, sales de ácidos inorgánicos y orgánicos, que incluye, pero no están limitados, a , ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido málico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido maléfico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fenilacético, ácido mandélico, y similares. Cuando los compuestos de la invención incluyen una función ácida tal como un grupo

carboxi entonces los pares de catión adecuados farmacéuticamente aceptables para el grupo carboxi son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica e incluyen cationes, alcalinos, alcalinotérreos, amonio, amonio cuaternario, y similares Para los ejemplos adicionales de "sales farmacéuticamente aceptables", ver *infra* y Berge et al, J Pharm Sci 66 1 (1977)

"Grupo protector" se refiere generalmente a grupos bien conocidos en la técnica que son utilizados para prevenir grupos reactivos seleccionados, tales como carboxi, amino, hidroxilo, mercapto y similares, de sufrir reacciones no deseadas, tales como nucleofílicas, electrofílicas, oxidación, reducción y similares Los grupos protectores preferidos son indicados aquí cuando son apropiados Los ejemplos de grupos protectores amino incluyen, pero no están limitados, aralquilo, aralquilo sustituido, ciclo alquenalquilo y cicloalqueno sustituido, alquilo, alquilo sustituido, acilo, alcoxicarbonilo, aralcoxicarbonilo, sililo y similares Ejemplos de aralquilo incluyen, pero no están limitados, a benzilo, ortometilbenzil, tritilo y benzhidrilo, que pueden ser opcionalmente sustituidos con halógeno, alquilo, alcoxi, hidroxilo, nitrilo, aclamino, acilo y similares, y sales tales como sales de fosfónio y sales de amonio Ejemplos de grupo anillo incluyen fenilo, naftilo, indanilo, antraceno, 9-(9-fenilfluorenilo), fenantrenilo, durenilo y similares Ejemplos de cicloalquenalquilo o los radicales cicloalquenalquilo sustituidos, preferiblemente tienen 6-10 átomos de carbón, incluyen, pero no están limitados a, ciclo hexenilmetilo y similares Los grupos acilo, alcoxicarbonilo y aralcoxicarbonilo adecuados incluyen benziloxycarbonilo, t-butoxicarbonilo, iso-butoxicarbonilo, benzoilo, benzilo sustituido, butirilo, acetilo, tri-fluoroacetilo, tri-cloroacetilo, eftaloilo y similares Una mezcla de grupos protectores se puede utilizar para proteger el mismo grupo amino, tal como un grupo amino primario puede ser protegido tanto por un grupo aralquilo como por un grupo aralcoxicarbonilo Los grupos

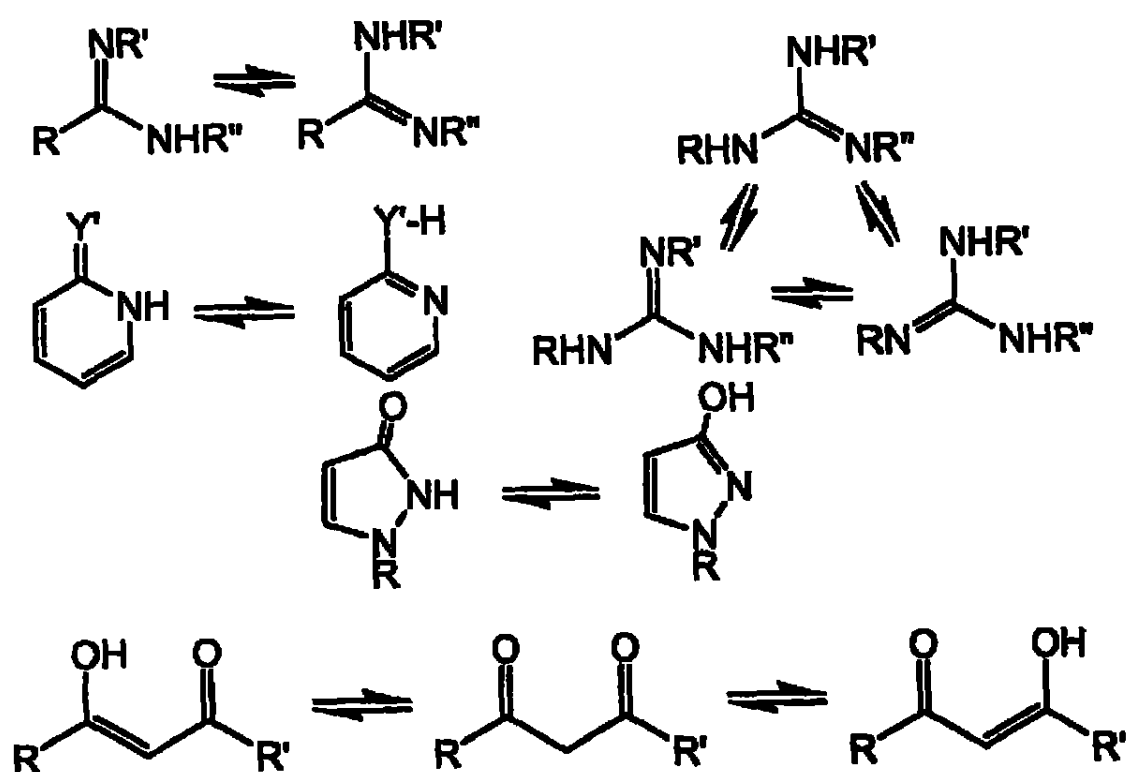
protectores amino también pueden formar un anillo de heterocíclico con el nitrógeno al cual ellos están unidos. Por ejemplo, 1,2 -bis (metileno) benceno, phtalimidilo, succinimidilo, maleimidilo y similares y donde estos grupos heterocíclicos pueden además incluir anillos aro y cicloalquilo adjuntos. Además, los grupos heterocíclicos pueden ser mono-, di- o tri- sustituidos, tal como nitroftalimidilo. Los grupos amino pueden también ser protegidos contra reacciones no deseadas tal como oxidación, a través de la formación de una sal de adición, tal como clorhidrato, ácido toluenosulfónico, ácido trifluoroacético y similares. Mucho de los grupos protectores amino también son adecuados para proteger grupos carboxy, hidroxy, y mercapto. Por ejemplo, los grupos aralquilo. Los grupos alquilo son grupos adecuados para proteger grupos hidroxi y mercapto tales como terc-butilo.

Los grupos protectores sililo son átomos de silicio opcionalmente sustituidos por uno o más alquilo, aro y aralquilo. Los grupos protectores sililo adecuados incluyen, pero no están limitados a, trimetilsililo, dietilsililo, tri-isopropilsililo, terc-butildimetilsililo, dimetilfenilsililo, 1,2-bis (dimetilsilil)benceno, 1,2-bis (dimetilsilil)etano y difenildimetilsililo. La sililación de los grupos aminos suministra grupos mono- o di- sililamino. Los compuestos de sililación de amino alcohol pueden conducir a un derivado N,N,O- tri-sililo. La remoción de la función sililo de una función silil éter es fácilmente lograda mediante el tratamiento con, por ejemplo, un reactivo de hidróxido metálico o de fluoruro de amonio, bien sea como una etapa de reacción discreta o in situ durante una reacción con el grupo alcohol. Los agentes sililantes adecuados son, por ejemplo, trimetilsilil cloruro, terc-butildimetilsililo, fenildimetilsilil cloruro, difenildimetilsilil cloruro o sus productos de combinación con imidazol o DMF. Los métodos para la sililación de las aminas y la remoción de los grupos protectores sililo son bien conocidos por aquellos expertos

en la técnica Los métodos de preparación de estos derivados de amino de los correspondientes aminoácidos, amidas de aminoácido o ésteres de aminoácido también son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica de química orgánica, incluyendo la química de ésteres de aminoácido o la química de amino alcohol

Los grupos protectores se remueven bajo condiciones las cuales no afectarán la porción restante de la molécula Estos métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen hidrólisis ácida, hidrogenólisis y similares Un método preferido involucra la remoción de un grupo protector, tal como la reacción de un grupo benziloxycarbonilo mediante hidrogenólisis que utiliza paladio sobre carbono en un sistema solvente adecuado tal como alcohol, ácido acético, y similares como estos aldehídos Un grupo protector t-butoxycarbonilo se puede remover utilizando un ácido inorgánico u orgánico, tal como HCL o ácido trifluoracético, en un sistema solvente adecuado, tal como dioxano o cloruro de metileno La sal amino resultante puede ser fácilmente neutralizada para producir la amina libre El grupo protector carboxi tal como metilo, etilo bencilo, Pert-butil, 4-metoxifenilmetilo y similares, se pueden remover bajo condiciones de hidrólisis e hidrogenólisis bien conocidas por aquellos expertos en la técnica

Se debe notar que los compuestos de la invención pueden contener grupos que pueden existir en formas tautoméricas, tales como amidina cíclica y acíclica y grupos guanidina, grupos eterolilos sustituidos por eteroátomo ($Y = O, S, NR$), y similares, que se ilustran en los siguientes ejemplos



Y aunque una forma es denominada, descrita, desplegada y/o reivindicada aquí, todas las formas tautoméricas pretenden estar inherentemente incluidas en tal denominación, descripción, despliegue y/o reivindicación

Las prodrogas de los compuestos de esta invención también están contempladas por esta invención. Una prodroga es un compuesto activo o inactivo que se modifica químicamente a través de acción fisiológica in vivo, tal como hidrólisis, metabolismo y similar, en un compuesto de esta invención luego de la administración de la prodroga a un paciente. La adecuabilidad y las técnicas involucradas en la elaboración y utilización de prodrogas son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Para una discusión general de las prodrogas que involucran ésteres, Svensson y Tunek *Drug Metabolism Reviews* 165 (1998) y Bundgaard *Design of Prodrugs*, Elsevier (1985). Los ejemplos de un anión carboxilato enmascarado incluyen una variedad de ésteres, tal como alquilo (por

ejemplo, metilo, etilo), cicloalquilo (por ejemplo, ciclo hexilo), aralquilo (por ejemplo, benzilo, p-metoxibenzilo), y alquilcarboniloxialquilo (por ejemplo, pivaloiloximetilo) Las aminas han sido enmascaradas como derivados sustituidos de anilcarboniloximetilo que son clivados por esterasas in vivo que liberan la droga libre y formaldehído (Bundgaard J Med Chem 2503 (1989)) También, las drogas que contienen un grupo NH ácido, tal como imidazol, imida, indol y similares, han sido enmascaradas con grupos N-aciloximetilo (Bundgaard Desingof Prodrugs Elsevier (1985)) Los grupos hidroxy se han enmascarado como esterres y éteres La EP 039,051 (Sloan and Little, 4/11/81) describe prodrogas de ácido hidroxámico con base Mannic, con su preparación y su uso

ESTRUCTURA DE PÉPTIDOS CONJUGADOS

In general Los péptidos conjugados de la presente invención se pueden describir por la siguiente fórmula



En donde

X^1 y Y^1 son independientemente en cada caso péptidos de la fórmula $-L^1-p^1$ y L^2-p^2 , respectivamente,

F es un vehículo covalentemente unido X^1 o Y^1 ,

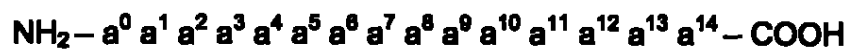
L^1 y L^2 son independientemente en cada caso ausente o ligadores que tienen de 0 a 9 residuos de aminoácido,

N es 0 a 3, y

p^1 y, si están presentes, p^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido o del receptor de bradiquinina B1

Los péptidos conjugados con vehículo de la fórmula IV comprenderán las modalidades prefendas en donde p^1 y, si está presente, p^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor de bradiquinina B1 que tiene una secuencia de péptido como se muestra en una cualquiera de las ID de SEC No 5-60 y derivados de estos

Las modalidades adicionales prefendas de los péptidos conjugados con vehículo incluirán péptidos conjugados con vehículo de la fórmula IV en donde p^1 y, si está presente, p^2 se define por la fórmula



En donde

a^0 es un aminoácido, aromático, alifático, heterocíclico o alicíclico básico o neutro, dipéptido o dipéptido, que contiene uno o dos residuos que tienen cadenas laterales básicas, o están ausentes,

a^1 , a^2 , a^3 y a^4 son independientemente en cada caso aminoácidos aromáticos, alifáticos, heterocíclicos o alicíclicos básicos o neutros,

a^6 es Ser,

a^5 , a^7 , y a^8 son independientemente en cada caso aminoácidos aromáticos, alifáticos, heterocíclicos, o alicíclicos, siempre y cuyo al menos uno de a^5 , a^7 , y a^8 se selecciona de Chg, Cpg, Igl_a, Igl_b, Niga y Nig_b de la configuración D-o L-, y a^9 , a^{10} , a^{11} , a^{12} , a^{13} , y a^{14} son independientemente en caso cualquier aminoácido natural este o estén ausentes

Más preferiblemente, P^1 y, si está presente, P^2 se define por la fórmula



en donde

a^0 es un aminoácido básico, un dipéptido que contiene uno o dos residuos con cadenas laterales básicas, o está ausente,

a^1 es un aminoácido básico,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 y a^6 son un aminoácido indanilo,

a^6 es Ser,

a^7 es un aminoácido D-indanilo,

a^8 es Cpg, y

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

Aun más preferiblemente, P^1 y, si está presente, P^2 se define mediante la fórmula



en donde

a^0 es un aminoácido básico, un dipéptido que contiene una o dos cadenas laterales básicas, o está ausente,

a^1 es un aminoácido básico,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 es Cpg

a^6 es Ser,

a^7 es DTic

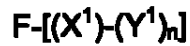
a^8 es Cpg, y

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

Aún más preferiblemente, los péptidos conjugados con vehículo de la presente invención incluyen péptidos conjugados con vehículos de la fórmula IV en donde $n=0$ y X^1 es un péptido seleccionado del grupo que consiste de los péptidos como se muestra en la ID de SEC No 27-41 y derivados de estos

La presente invención también suministra péptidos conjugados con PEG que se unen y antagonizan la actividad de los receptores de bradiquinina B1 (B1) y que han demostrado propiedades farmacocinéticas superiores in vivo comparados con los antagonistas de péptido B1 no conjugado. Los péptidos conjugados con

[PEG de la presente invención se pueden describir mediante la siguiente fórmula
(V)



en donde

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

F es una porción PEG covalentemente unida a X^1 o Y^1 ,

L^1 y L^2 son independientemente en cada caso ausentes o ligadores que tiene de 0 a 9 residuos de aminoácido,

n es 0 a 3, y

P^1 y, si está presente, P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor de bradiquinina B1

Los péptidos conjugados con PEG de la fórmula V comprenderá modalidades prefendas P^1 y, si está presente P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor de bradiquinina B1 que tiene una secuencia de péptido como se muestra una cualquier de la ID de SEC No 5-60 y derivados de estos

Las modalidades preferidas adicionales de los péptidos conjugados compuesto PEG incluirán conjugados con PEG de la fórmula V en donde P^1 y, si está presente, P^2 se definen mediante la fórmula



En donde

a^0 es un aminoácido aromático, alifático, heterocíclico, o alicíclico, básico o neutro, dipéptido o tripéptido básico, o están ausentes,

a^1 , a^2 , a^3 , y a^4 son independientemente en cada caso aminoácidos aromáticos, alifáticos heterocíclicos, o alicíclicos, básicos o neutros,

a^5 es Ser

a^5 , a^7 y a^8 son aminoácidos aromáticos, alifáticos, heterocíclicos, o alicíclicos, siempre y cuyo al menos uno de a^5 , a^7 y a^8 se seleccionen de Chg, Cpg, Igl, Iglb, Niga y Nigb de la configuración D-o L-, y

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

Más preferiblemente, P^1 y, si está presente, P^2 se definen mediante la fórmula



en donde

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

a^1 es un aminoácido básico,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 y a^6 son un aminoácido indanilo,

a^6 es Ser,

a^7 es un aminoácido D-indanilo,

a^8 es Cpg, y

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

Aun más preferiblemente, P^1 y, si está presente, P^2 se define mediante la fórmula



en donde

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

a^1 es un aminoácido básico,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 es Cpg

a^6 es Ser,

a^7 es DTic,

a^8 es Cpg, y

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

Los péptidos conjugados PEG aun más preferidos de la presente invención incluyen péptidos conjugados PEG de la fórmula V en donde $n=0$ y X^1 es un péptido seleccionado del grupo que consiste de péptidos que tienen una secuencia de aminoácido como se muestra en la ID de SEC No 27-41 y derivados de estos. Aun los péptidos conjugados con PEG aun más preferidos de la presente invención incluyen en donde $n=0$ y X^1 es un péptido seleccionado del grupo que consiste de péptidos que tiene una secuencia de aminoácido como se muestra en la ID de SEC No 27-41 y derivados de estos. Aun más preferiblemente los péptidos conjugados con PEG de la presente invención se pueden describir mediante la siguiente fórmula



o una sal fisiológicamente aceptable de este,

en donde

F' es un vehículo multivalente,

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

en donde R está covalentemente unido a F' ,

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

L^1 y L^2 son independientemente en cada caso ausentes o ligadores que tiene de 0 a 9 residuos de aminoácido,

n es 0 a 3,

z es 2 a 8, y

P¹ y P² son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor de bradiquinina B1

Los péptidos conjugados con PEG aun más prefendos de la presente invención incluyen péptidos conjugados con PEG de la fórmula VI en donde n es 0, z es 4 a 8, y X¹ es un péptido seleccionado del grupo que consiste de péptidos que tienen una secuencia de aminoácido como se muestra en la ID de SEC No 27-41 y derivados de estos

También se pretende como parte de la presente invención los conjugados de péptido que tiene secuencias de péptido que son fragmentos (es decir "subsecuencias") análogos, y derivados de P¹ y, si está presente, P² como se define aquí en donde tales péptidos conjugados son substancialmente equivalentes con respecto a la actividad in vitro y/o in vivo anti-B1 como los conjugados de péptido específicamente descritos aquí

El término "análogo" pretende significar moléculas que representan una o más sustituciones de aminoácido, supresiones y/o adiciones derivadas del arreglo lineal de los aminoácidos de los péptidos, los péptidos conjugados (P¹ no conjugado y, si está presente, P²) y/o un ligador peptídico (L) de los péptidos conjugados con vehículo o PEG suministrados por las fórmulas (IV) y (V), respectivamente, las cuales resultan en moléculas que son substancialmente equivalentes con respecto a la actividad in vitro y/o in vivo anti-B1 comparada con

el péptido no conjugado análogo o el péptido conjugado descrito específicamente aquí

Los análogos de péptido conjugados de acuerdo con esta invención tendrán típicamente una o más sustituciones de aminoácido, supresiones y/o inserciones en la secuencia de (P) (P¹ y/o, si está presente, P²) o (L) (L¹ y/o, si está presente, L²) Se reconoce generalmente que los cambios conservadores de aminoácido probablemente al menos perturban la estructura y/o la función de un polipéptido e involucran generalmente sustituciones de un aminoácido con otro que es similar en estructura y/o función (por ejemplo, aminoácidos con cadenas laterales similares en tamaño, carga y/o forma) La naturaleza de estas sustituciones son bien conocidas por un experto en la técnica y los ejemplos de sustituciones de aminoácido se resumen en las tablas 1 y 2

Tabla 1 Sustituciones de Aminoácido

Básico

Arg, Lys, His,

Acídico

Glu, Asp,

Polar

Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr

Hidrofílico

Asp, Glu, Asn, Ser, Thr, Tyr

Hidrófobo

Ala, Met, Ile, Leu, nor-Leu, Val

Aromático

Phe, Trp, Tyr

Pequeño

Gly, Ala, Ser, Thr, Met

Tabla 2 Sustituciones de Aminoácido

<u>Aminoácido</u>	<u>Sustituciones Prefendas</u>	<u>Sustitución más Prefenda</u>
Ala	Gly, Leu, Ile, Asn, Pro	val
Arg	Ala, Asn, Gln, Ser	Lys
Asn	Arg, Gln, His, Lys, Ser, Tyr	Gln
Asp	Asn, Ser, Thr, Gln	Glu
Cys	Ala	Ser
Gln	Ala, Arg, Glu, Leu, Lys, Met, Ser, Tyr	Asn
Glu	Ala, Arg, Glu, Leu, Lys, Met, Ser, Tyr	Asp
Gly	Gln, Ser, Thr, Asn	Pro
His	Asn,, Gln, Lys, Tyr, Phe	Arg
Ile	Tyr, Val, Met, Ala, Phe, nor-Leu	Leu
Leu	nor-Leu, Ile , Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Asn, Asp, Ala, Glu, Gln, Ser, Tyr	Arg
Met	Ala, Gln, Tyr, Trp, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile , Ala, Met	Leu
Pro	Ile , Val	Gly
Ser	Ala, Asn, Asp, Gly, Lys	Thr

Thr	Ala, Gly, Ile, Val, Lys	Ser
Trp	Phe, Tyr, His	Tyr
Tyr	Trp, Thr, Ser	Phe
Val	Ala, Ile, Met, Phe, Tyr, nor-Leu	Leu

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

Las sustituciones de aminoácidos deseadas (sean conservadoras o no conservadoras) se pueden determinar por aquellos expertos en la técnica en el momento en que se deseen tales sustituciones. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácido se pueden utilizar para identificar residuos importantes de la secuencia de péptido, o incrementar o disminuir la afinidad de las moléculas de péptido no conjugadas y/o conjugadas descritas aquí.

En ciertas modalidades, las sustituciones de aminoácido conservadoras también comprenden residuos de aminoácido de ocurrencia no natural que son incorporados típicamente, mediante síntesis química de péptido.

Como se anota en la sección anterior los residuos de ocurrencia natural se pueden dividir en clases basadas en propiedades de cadena lateral común que pueden ser útiles para modificaciones de secuencia. Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden involucrar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos de sustituidos se pueden introducir en regiones del péptido que son homólogas con ortólogos no humanos, o en regiones no homólogas de la molécula. Además, uno también puede hacer modificaciones utilizando P o G con el propósito de influenciar la orientación de la cadena.

Para elaborar tales modificaciones, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. Cada aminoácido ha sido asignado a un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y las características de la carga, estas son isoleucina (+4.5), valina (+4.2), leucina (+3.8), fenilalanina (+2.8), cisteína/cistina (+2.5), metionina (+1.9), alanina (+1.8), glicina (-0.4), treonina (-0.7), serina (-0.8), triptófano (-0.9), tirosina (-1.3), prolina (-1.6), histidina (-3.2), glutamato (-3.5), glutamina (-3.5), aspartato (-3.5), asparagina (-3.5), lisina (-3.9), y arginina (-4.5).

La importancia del índice de aminoácido hidropático para conferir función biológica interactiva sobre una proteína se entiende en la técnica. Quate *et al*, J Mol Biol, 157 105-131 (1982). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por ciertos aminoácidos que tienen un índice o una calificación hidropática similar y retienen aun una actividad biológica. Para elaborar los cambios basados en el índice hidropático, la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 es el preferido, aquellos que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de ± 0.5 son aun más particularmente preferidos.

También se entiende en la técnica que las sustituciones de aminoácidos similares pueden ser hechas efectivamente sobre la base de la hidrofiliidad. La hidrofiliidad promedio local más grande de una proteína, conducida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y su antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a residuos de aminoácidos: arginina (+3.0), lisina (+3.0), aspartato (+3.0 $\pm$ 1), glutamato (+3.0 $\pm$ 1), serina (+0.3), asparagina (+0.2), glutamina (+0.2), glicina (0), treonina (-0.4), prolina (-0.5 $\pm$ 1), alanina (-0.5), histidina (-0.5), cisteína (-1.0), metionina (-1.3), valina (-1.5), leucina (-1.8), isoleucina (-1.8), tirosina (-2.3), fenilalanina (-2.5), triptofano (-3.4). Para la elaboración de los cambios basados en valores de hidrofiliidad similares la sustitución de los aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 es la preferida, aquellos que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos que están entre ± 0.5 son aun más particularmente preferidos. Uno también puede identificar epítopos de secuencia de aminoácido primario sobre la base de la hidrofiliidad. Estas regiones son también denominadas como "regiones de núcleo epitépico".

El experto será capaz de determinar los análogos adecuados de los péptidos no conjugados y/o conjugados establecidos aquí utiliza técnicas bien conocidas. Un experto en la técnica también sabría que uno puede sustituir químicamente aminoácidos similares por residuos que ocurran en el péptido nativo aunque reteniendo la actividad (sustituciones conservadoras de residuo de aminoácido). Por lo tanto, aun áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden ser sometidas a sustituciones conservadoras de aminoácido sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente la estructura de péptido no conjugado o la de péptido conjugado.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar los estudios de función de estructura que identifican residuos dentro de la secuencia de péptido no conjugada y/o conjugada que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de tal comparación, uno puede predecir la importancia de los residuos de

aminoácido en una secuencia de péptido. Un experto en la técnica puede optar por sustituir sustituciones de aminoácido químicamente similares por tales residuos de aminoácido importantes predichos de péptidos no conjugados y/o conjugados de la presente invención.

Un número de publicaciones científicas han sido dedicadas a la predicción de la estructura secundana. Ver Moulton J, Curr Opin in Biotech, 7(4) 422-427 (1996), Chou et al, Biochemistry, 13 (2) 222-245 (1974), Chou et al, Biochemistry, 113 (2) 211-222 (1974), Chou et al, Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 47 45-148 (1978), Chou et al, Ann Rev Biochem, 47 251-276 y Chou et al, Biophys J, 26 367-384 (1979). Más aún, los programas de computador están habitualmente disponibles para ayudar con la predicción de la estructura secundana.

Los métodos adicionales de predecir estructuras secundanas incluyen "threading" (Jones, D, Curr Opin struct Biol, 7 (3) 377-87 (1997), Sippl et al Structure, 4 (1) 15-9 (1996)), "profile analysis" (Bowie et al Science, 5 253 164-170 (1991), Grnbskov et al, Met Enzym, 183 146-159 (1990), Grnbskov et al, Proc Nat Acad Sci, 84 (13) 4355-8 (1987)), y "evolutionary linkage" (Ver Home, supra, y Brenner, supra).

Los análisis de péptido y de péptido conjugado y los derivados de acuerdo con la invención serán útiles para los mismos propósitos para los cuales los péptidos análogos y/o los péptidos conjugados específicamente descritos aquí son útiles (es decir, antagonistas de la actividad B1 in vitro y/o in vivo).

Péptidos Los péptidos de la presente invención incluyen péptidos que comprenden las secuencias mostradas en la ID de SEC No 15-35 y 39-54 Las secuencias de péptido P¹ y, si están presentes, P² (P) dentro de los péptidos conjugados a vehículo o a PEG de la presente invención incluyen, como se mencionó, péptidos que se unen a y antagonizan (por ejemplo, disminuyen) a actividad de B1 Los péptidos preferidos conjugados a vehículo o a PEG de la presente invención comprenden al menos una secuencia de péptido seleccionado del grupo que consiste de la ID de SEC No 5-60 y derivados de estos Más preferiblemente, los péptidos conjugados a vehículo o a PEG de la presente invención comprenden al menos una secuencia de péptido seleccionada del grupo que consiste de la ID de SEC No 27-41 y derivados de estos

Tabla 3 – Péptidos de Bradiquinina

Receptor/Efecto	Péptido	Secuencia de Péptido
Agonista B2/B1	Bradiquinina, BK (ID de SEC No 1)	Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
Agonista B2	Kalidina Lys-BK (ID de SEC No 2)	Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
Agonista B2	Met-Lysb-Bk (ID de SEC No 3)	Met Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
Agonista B1	Des-Arg-BK (ID de SEC No 4)	Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
Antagonista B1	[LeuB]-Des-Arg-BK (ID de SEC No 5)	Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
Antagonista B1	DALK (ID de SEC No 6)	Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
Antagonista B2	(ID de SEC No 7)	DArg Arg Pro Hyp Gly Thi Ser DTic Oic Arg
Antagonista B1/B2	(ID de SEC No 8)	DArg Arg Pro Hyp Gly Thi Ser DTic Oic

Antagonista B2	(ID de SEC No 9)	DArg Arg Pro Hyp Gly Thi Ser DHpe Oic Arg Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 10)	Ac Lys Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile
Antagonista B1/B2	(ID de SEC No 11)	DArg Arg Pro Hyp Gly Igl Ser Digl Oic Arg
Antagonista B1	(ID de SEC No 12)	Lys Lys Arg Pro Hyp Gly Igl Ser Digl Oic
Antagonista B1/B2	(ID de SEC No 13)	Lys Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 14)	DArg Arg Pro Hyp Gly Igl Ser Df5f Igl Arg
Antagonista B1	(ID de SEC No 15)	DOmLys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 16)	DOmLys Arg Pro Thz Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 17)	3Palys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 18)	4Palys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 19)	Cha Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 20)	2-Nal Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 21)	Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 22)	DLysLys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 23)	Lys DOm Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 24)	Lys Cha Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 25)	Lys Abu Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No	Lys 2-Nal Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser

	26)	Dtic Cpg D-
Antagonista B1	(ID de SEC No 43)	Dab Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg D-
Antagonista B1	(ID de SEC No 44)	Ac Dab Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 45)	DOmLys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg
Antagonista B1	(ID de SEC No 46)	Ac DOmLys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg D- 3'Pa
Antagonista B1	(ID de SEC No 47)	1 Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg D- 3'Pa
Antagonista B1	(ID de SEC No 48)	Ac 1 Lys Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg D- D-2-
Antagonista B1	(ID de SEC No 49)	Lys Nal Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg D-2-
Antagonista B1	(ID de SEC No 50)	Lys Nal Arg Pro Hyp Gly Cpg Ser Dtic Cpg Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 51)	DOm Arg Oic Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 52)	Ac DOm Arg Oic Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 53)	DOm LysArg Oic Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 54)	Ac DORnLys Arg Oic Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 55)	Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 56)	Ac Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 57)	Om Arg Oic Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 58)	Ac Om Arg Oic Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile Me-
Antagonista B1	(ID de SEC No 59)	Lys Arg Oic Pro Gly Phe Ser D-β-Nal Ile Me-

Antagonista B1	(ID de SEC No 60)	Ac Lys Arg Orc Pro Gly Phe Ser D- β-Nal Ile Me-
----------------	-------------------	--

Vehículos El término "vehículos" como se utiliza aquí se refiere a una molécula que evita la degradación y/o incrementa la vida media, reduce la toxicidad, reduce la inmunogenicidad, o incrementa la actividad biológica del péptido terapéutico o la proteína. Los vehículos útiles en el contexto de la presente invención son conocidos en la técnica. Por ejemplo, ver publicación WO 98/07746, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad) y son todos fácilmente disponibles para aquellos expertos en la técnica. En el contexto de la presente invención, los vehículos preferidos incluyen, pero no están limitados a, polimetilén-glicol, polihidroxipropilenglicol, polipropilenglicoles y óxidos, polimetilpropilenglicol, polihidroxi-propilén-óxido, polipropilenglicoles de cadena recta y cadena ramificada y derivados de estos, polietilenglicol y polipropilenglicol y éteres de monometilos, éteres de monocetilo éteres de mono-n-butilo, mono-t-butiléteres y monooleol éteres de estos, ésteres de polialquilenglicoles con ácidos carboxílicos y productos de condensación, deshidratación de los polialquileneglicoles con aminas y otros polialquileno óxidos y glicoles y derivados de estos, poli (vinilpirrolidona), polivinil alcohol, poli (vinil acetato), el copolímero poli (vinil acetato-co-vinil alcohol), poliviniloxazolidona, poli (vinilmetiloxazolidona y poli (vinil metil éter), poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico)s, polihidroxietilmetacrilatos, poli(acrilamida y poli(metacrilamida) y otras amidas - de estos, poli (N,N-dimetilacrilamida), poli (N-isopropilacrilamida), poli (N-acetamidoacrilamida) y poli (N-acetamidometacrilamida, y otros derivados N-sustituidos de las amidas.

Un aspecto de la invención requiere al menos la presencia de un vehículo (F) unido a una porción ligadora no peptídica o a un residuo de aminoácido de un

ligador peptídico que está covalentemente fusionado a un antagonista de péptido B1 En el contexto de la presente invención, el vehículo preferido constituye una molécula PEG, como se definió aquí Un vehículo aun más preferido constituye una molécula de PEG multivalente como se definió aquí

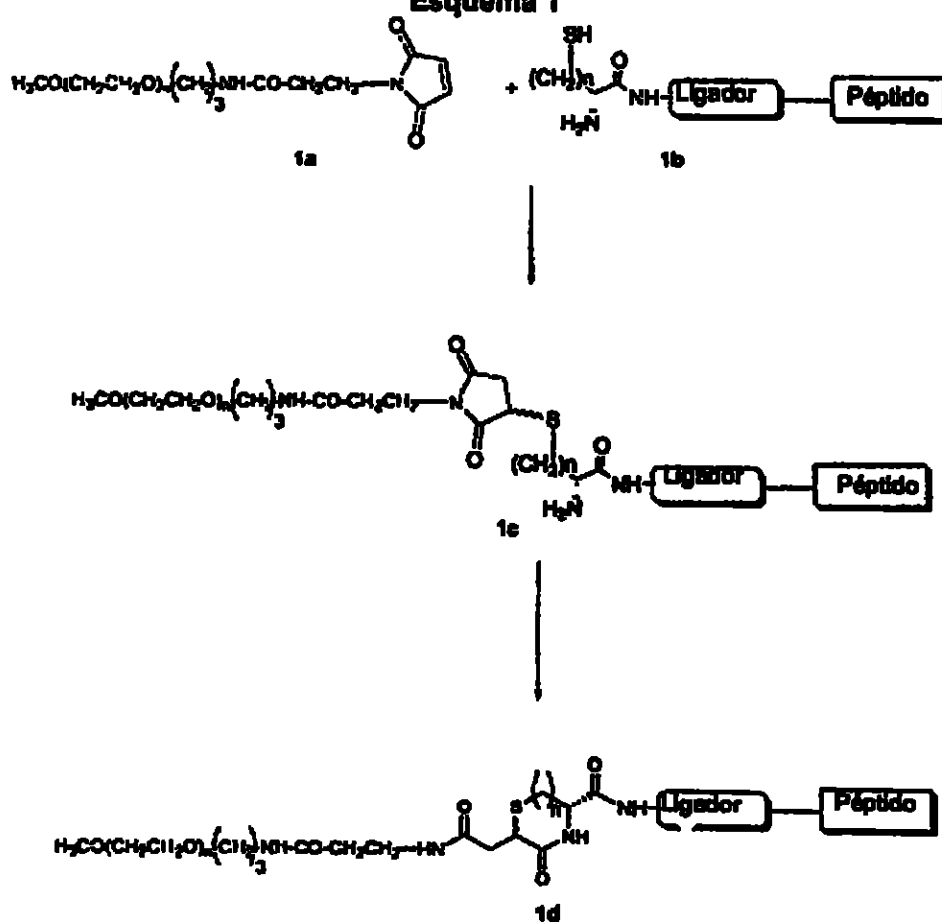
Las moléculas de conjugado de vehículo o PEG específicamente descritas o referenciadas aquí pueden ser ligeramente modificadas por las regiones denotadas por $(X^1)-(Y^1)_n$ (como se definió supra) para formar un análogo de acuerdo con la invención, siempre y cuando el antagonismo de B1 sea substancialmente mantenido

Como entre los péptidos conjugados a vehículo o PEG de la presente invención y los análogos de estos, es preferible que no más de tres residuos no terminales en la región (P) sean diferentes Más preferiblemente, los análogos contemplados por la presente invención incluyen moléculas con hasta dos sustituciones de aminoácido, inserciones o supresiones y cualquier locus no terminal de la región (P) del péptido conjugado de vehículo o a PEG de la presente invención Más preferiblemente, la divergencia de la secuencia entre el péptido conjugado vehículo o PEG de la presente invención y un análogo contemplado de este, particularmente en la región especificada (P), está en la forma de una o más "modificaciones conservadoras"

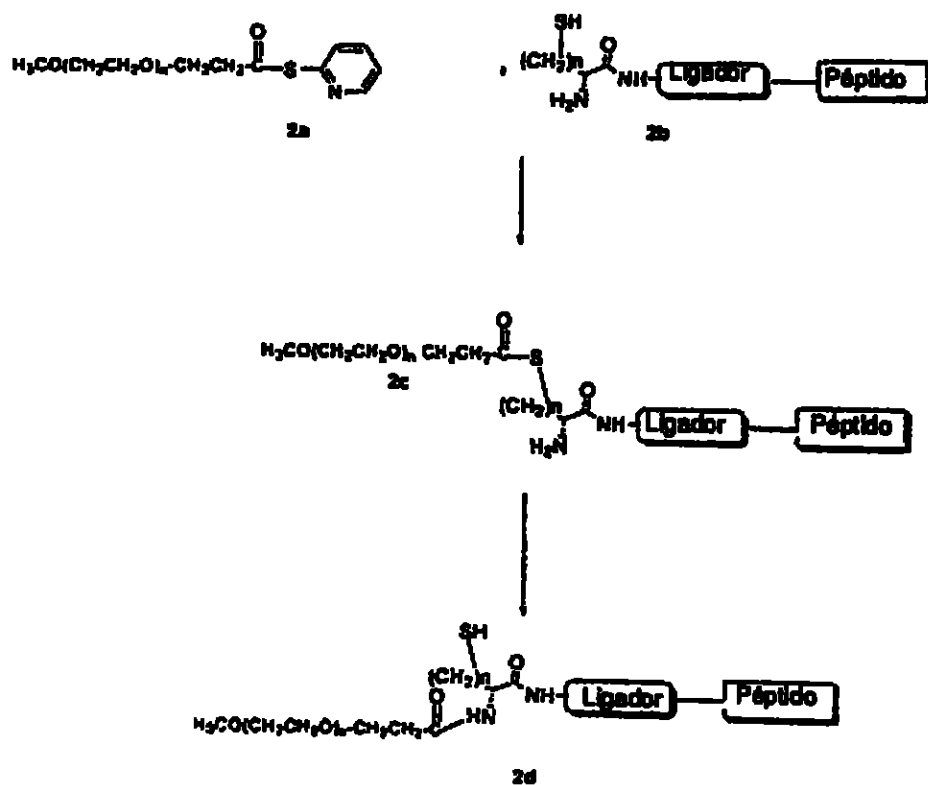
Ligadores El término "ligador" como se utiliza aquí se refiere a L^1 y, si está presente, L^2 como se muestra en la fórmula IV y V (*supra*) y está abreviada aquí por (L) Preferiblemente, (L) es peptídico de naturaleza (es decir, hecho de los mismos aminoácidos ligados juntos por los enlaces péptido) y hecho desde 1 a 9 aminoácidos Más preferiblemente, (L) se hace desde 1 a 9 aminoácidos, en

donde los aminoácidos son seleccionados de veinte aminoácidos de ocurrencia natural. En una modalidad aun más preferida los 1 a 9 aminoácidos del ligador peptídico son seleccionados de cisteína, glicina, alanina, prolina, arginina, asparagina, glutamina, y lisina. Aun más preferiblemente, un ligador peptídico se hace hasta de una mayoría de aminoácidos que son estéricamente no ocultos, tal como glicina y alanina ligados por un enlace péptido. Así, los ligadores peptídicos preferidos son poli (Gly)₁₋₈, particularmente (Gly)₃ (ID de SEC No 100), (Gly)₅ (ID de SEC No 101) y (Gly)₇ (ID de SEC No 102), así como también poli (Gly-Ala)₂₋₄ y poli(Ala)₁₋₈. Otros ejemplos específicos de los ligadores peptídicos incluyen (Gly)₅Lys (ID de SEC No 103), y (Gly)₅LysArg (ID de SEC No 104). Otras combinaciones de Gly y Ala también son preferidas. Para explicar la nomenclatura anterior por ejemplo (Gly)₅Lys se significa Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys. Un ligador peptídico puede contener una cisteína N-terminal, otro tiol, un nucleófilo para conjugación con un vehículo. Un ligador más preferido contiene una cisteína N-terminal o un residuo de homocisteína, u otra porción 2-amino-etanotiol o 3-amino-propanotiol para conjugación a vehículos funcionalizados maleimida, yodoacetamida o tioéster. El tratamiento con el aducto 3-sulfanil succinimida inicial (1c) formado por la reacción de un péptido con PEG activado con maleimida, con base en exceso convierte el aducto succinimida menos estable a la forma 6-metilcarbamoil-5-oxo-tiomorfolino-3-carboxamida hidrolíticamente estable (Id, Esquema 1). Alternativamente, el tioéster comercialmente disponible o el yodoacetamido PEG (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) se puede utilizar para conjugación quimioselectiva como se describe en los esquemas 2 y 3.

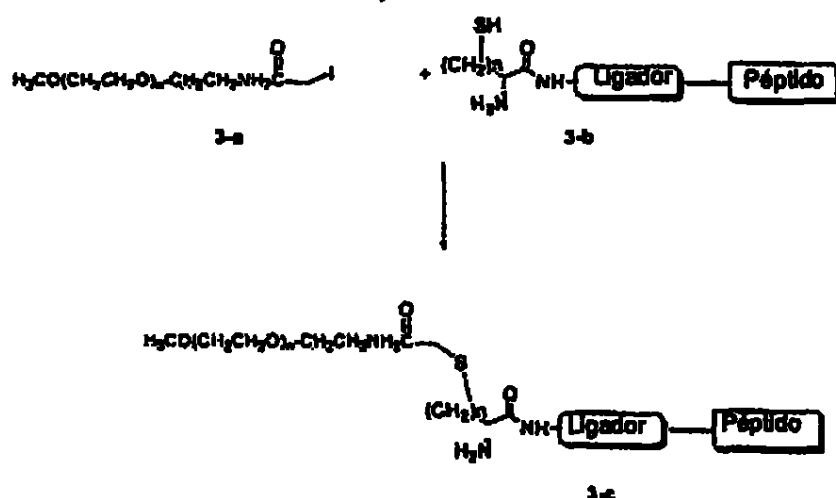
Esquema 1



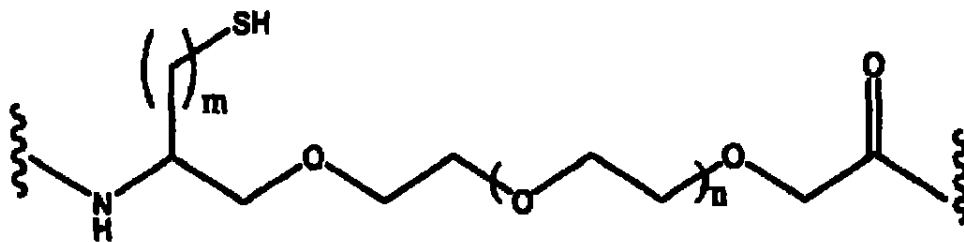
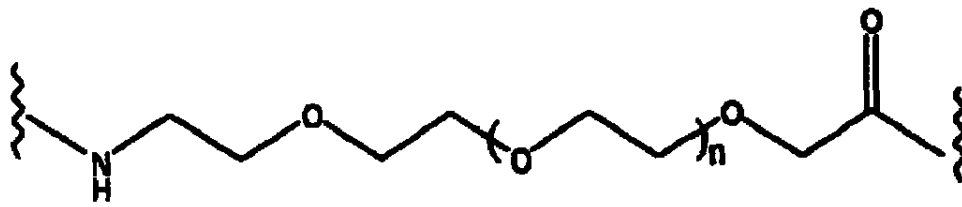
Esquema 2



Esquema 3



Otro ligador prefendo es un ligador largo, flexible que comprende una secuencia Gly/Ser/Thr aleatoria (GSGSATGGSGSTASSGSGSATH, (ID de SEC No 105) que se estima que sea de aproximadamente un tamaño de una molécula PEG de 1k. Adicionalmente, el ligador peptídico puede comprender un segmento no peptídico tal como una molécula alifática de 6 carbonos de la fórmula $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (Ligador rígido -AEAAAKEAAAKEAAKAGG-). Alternativamente, un ligador no peptídico que contiene un nucleófilo reactivo puede estar presente en X^1 y, si está presente Y^1 . Por ejemplo, los ligadores alquilo tales como $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_s-\text{C}(\text{O})-$, en donde $s = 2-20$ podrían ser utilizados. Estos ligadores alquilo pueden además ser sustituidos por cualquier grupo no estéricamente oculto tal como alquilo inferior (por ejemplo, C_1-C_8), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH_2 , fenilo, etc. Ligadores no peptídicos de ejemplo son los ligadores PEG (mostrados adelante).



en donde n es tal que el ligador tiene un peso molecular de 100 a 5000 kilodaltons (kD), preferiblemente 100 a 500 kD m es = 1-3 Preferiblemente, un ligador no peptídico es aromático Los ligadores se pueden alterar para formar derivados de la misma manera como se describió aquí

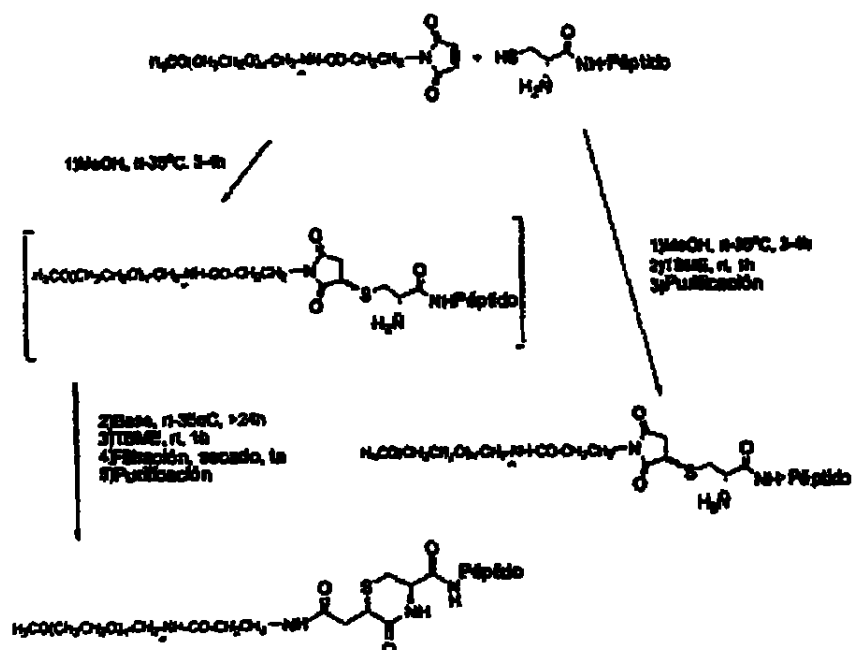
Además, las porciones PEG se pueden unir a la amina N-terminal o seleccionar aminas de cadena lateral mediante alquilación reductiva utilizando aldehídos PEG o acilación utilizando hidroxysuccinimido o ésteres de carbonato de PEG Cualquiera de los ligadores descritos anteriormente se puede utilizar en esta aproximación Alternativamente, un PEG adecuadamente funcionizado se puede unir directamente a cualquiera de los antagonistas de péptido del receptor de bradiquinina B1 como se muestra en la ID de SEC No 5-26 o ID de SEC No 43-60 o directamente a un residuo de aminoácido de un ligador peptídico que está covalentemente fusionado a cualquiera de los antagonistas de péptido del receptor de bradiquinina B1 como se muestra en la ID de SEC No 5-26 o 43-60

Se apreciará que, e razón a que el vehículo y/o los péptidos blanco pueden ser multivalentes, es posible por el proceso de la invención producir una variedad de estructuras vehículo péptido. Por vía de ejemplo, un vehículo univalente y un péptido univalente producirán un conjugado 1:1, un péptido bivalente y un vehículo univalente pueden formar conjugados en donde los conjugados de péptido llevan dos porciones de vehículo mientras un vehículo bivalente y un péptido univalente pueden producir especies donde dos entidades de péptido estén ligadas a una porción de vehículo simple, el uso de vehículos valentes pueden conducir a la formación de grupos de entidades de péptido unidos a una porción de vehículo simple mientras que los péptidos con Valente mayor se pueden incrustar con una pluralidad de porciones de vehículo. Las porciones de péptido pueden tener más de un grupo reactivo el cual reaccionará con el vehículo activado y la posibilidad de formar estructuras complejas debe ser considerada, cuando se desea formar estructuras simples tal como los aductos 1:1 del vehículo y péptido, o el uso de vehículos divalentes para formar aductos de péptido: vehículo: péptido, será benéfico utilizar proporciones predeterminadas vehículo activado y material de péptido, concentraciones predeterminadas de estos y conducir las reacciones bajo condiciones predeterminadas (tal como la duración, temperatura, pH etc.) con el fin de formar una proporción del producto descrito y luego separar el producto descrito de los otros productos de reacción. Las condiciones de reacción, proporciones y concentraciones de los reactivos se pueden obtener mediante experimentos ensayo y error relativamente simples que estén dentro de la capacidad de una persona mediante versada en la materia con el apropiado escalamiento según sea necesario. La purificación y separación de los productos se logra similarmente mediante técnicas convencionales bien conocidas por aquellos expertos en el arte. Sin embargo, como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones finales, en las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen los

referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia "un antagonista de péptido conjugado con vehículo" o "un antagonista de péptido conjugado con PEG" incluye las mezclas de tales conjugados y la referencia a "el método de tratamiento" incluye referencia a uno o más métodos de tratamiento del tipo que será conocido por aquellos expertos en el arte o se volverá conocido por aquellos luego de leer esta especificación, y así sucesivamente.

Las PEGilaciones convencionales a través de la conjugación de la mPEG-maleimida con el grupo tiol de los péptidos y los polipéptidos que tienen residuos de aminoácidos cisteína son procesadas en un amortiguador de fosfato con o sin solvente orgánico. La alta solubilidad de los péptidos PEGilados y los polipéptidos y la inestabilidad potencial del anillo de pirrolidin-2,5-diona en agua han enredado la aplicación de este método a producción en gran escala y purificación de los péptidos y proteínas PEGilados. Por lo tanto, nosotros describimos aquí unas condiciones novedosas no acuosas para la conjugación de la mPEG-maleimida con grupo tiol de péptidos y polipéptidos que tienen residuos cisteína. El proceso novedoso da como resultado en moderado a altos rendimientos de péptidos y polipéptidos PEGilados y combinan la adición de Michael y la aminólisis en un recipiente (sistema 4). Ambas condiciones dan como resultado directo aislamiento de péptidos PEGilados y los polipéptidos a través de una precipitación.

Esquema 4



En otra modalidad el proceso descrito en el esquema 4, en conjunto con cualquiera de las anteriores o siguientes modalidades, el metanol (MeOH) se puede sustituir con un solvente que comprende uno o más de los siguientes solventes etanol, metanol, isopropil alcohol, n-propanol, n-butanol, diclorometano, (DCM), acetonitrilo (AcN) tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMAc), y N-metilpirrolidona (NMP)

En otra modalidad del proceso descrito en el esquema 4, en conjunto con cualquiera de las anteriores o siguientes modalidades, el TBME se puede constituir con un solvente que comprende uno o más de los siguientes solventes dietil éter, metil isopropiléter, y diisopropil éter

En otra modalidad del proceso descrito en el esquema 4, en conjunto con cualquiera de los anteriores o siguientes modalidades, la reacción 1) como se describe en el esquema 4 se puede conducir a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C Preferiblemente, la reacción 1)

como se describe en el esquema 4 se puede conducir a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C Más preferiblemente, la reacción 1) como se describe en el esquema 4 se puede conducir a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C Más preferiblemente la reacción 1) como se describe en el esquema 4 se puede conducir a temperatura ambiente

En otra modalidad el proceso descrito en el esquema 4, en conjunto con cualquiera de las anteriores o siguientes modalidades, la reacción 2) como se describe en el esquema 4 se puede conducir a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C Preferiblemente, la reacción 2) como se describe en el esquema 4 se puede conducir a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C Más preferiblemente, la reacción 1) como se describe en el esquema 4 se puede conducir a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C Más preferiblemente la reacción 2) como se describe en el esquema 4 se puede conducir a temperatura ambiente

En otra modalidad el proceso descrito en el esquema 4, en conjunto con cualquiera de las anteriores o siguientes modalidades, la reacción de precipitación como se describe en el esquema 4 se puede conducir durante al menos 10 minutos Más preferiblemente, la reacción de precipitación como se describe en el esquema 4 se puede conducir durante al menos 60 minutos Más preferiblemente, la reacción de precipitación como se describe en el esquema 4 se conduce durante aproximadamente 60 minutos

En otra modalidad el proceso descrito en el esquema 4, en conjunto con cualquiera de las anteriores o siguientes modalidades, la precipitación, filtración, y/o reacción de purificación se puede conducir más de una vez

En otra modalidad el proceso descrito en el esquema 4, en conjunto con cualquiera de las anteriores o siguientes modalidades, las reacciones de precipitación y/o purificación se pueden conducir más de una vez

Los péptidos parcialmente protegidos son reactivos especialmente útiles para esta estrategia en la medida en que ellos posibilitan la modificación selectiva de los sitios específicos de los péptidos poli funcionales. Los grupos protectores se remueven de los conjugados PEG utilizando métodos de desprotección establecidos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica de síntesis de péptido. Los péptidos parcialmente protegidos adecuados para esta aplicación se pueden preparar utilizando estrategias de protección ortogonal bien conocidas por las personas expertas en el arte de síntesis de péptidos. Una ilustración de la síntesis y la conjugación de un antagonista de péptido parcialmente protegido del receptor de bradiquinina B1 se describe en el esquema 5. Los análogos en los cuales las aminas de cadena lateral sirven como sitios de conjugación se pueden preparar de aminoácidos básicos fácilmente disponibles ortogonalmente protegidos.

BocNH(CH2)4C(=O)N1C(=O)CC1 **5a**
 $\xrightarrow[2. \text{OCC N-Hydroxysuccinimide}]{1. \text{BocNH(CH2)4NH2}}$
BocNH(CH2)4C(=O)N1C(=O)CC1C(=O)N2C(=O)CC2C(=O)N3C(=O)CC3 **5c**

$\xrightarrow[2. 20\% \text{ Piperidine}]{1. \text{NH}_2\text{-Arg-AA}_1\text{-AA}_2\text{-AA}_3\text{-AA}_4\text{-AA}_5\text{-AA}_6\text{-AA}_7\text{-AA}_8\text{-OH}}$
BocNH(CH2)4C(=O)N1C(=O)CC1C(=O)N2C(=O)CC2C(=O)N3C(=O)CC3C(=O)N4C(=O)CC4C(=O)N5C(=O)CC5C(=O)N6C(=O)CC6C(=O)N7C(=O)CC7C(=O)N8C(=O)CC8C(=O)N9C(=O)CC9C(=O)N10C(=O)CC10C(=O)N11C(=O)CC11C(=O)N12C(=O)CC12C(=O)N13C(=O)CC13C(=O)N14C(=O)CC14C(=O)N15C(=O)CC15C(=O)N16C(=O)CC16C(=O)N17C(=O)CC17C(=O)N18C(=O)CC18C(=O)N19C(=O)CC19C(=O)N20C(=O)CC20C(=O)N21C(=O)CC21C(=O)N22C(=O)CC22C(=O)N23C(=O)CC23C(=O)N24C(=O)CC24C(=O)N25C(=O)CC25C(=O)N26C(=O)CC26C(=O)N27C(=O)CC27C(=O)N28C(=O)CC28C(=O)N29C(=O)CC29C(=O)N30C(=O)CC30C(=O)N31C(=O)CC31C(=O)N32C(=O)CC32C(=O)N33C(=O)CC33C(=O)N34C(=O)CC34C(=O)N35C(=O)CC35C(=O)N36C(=O)CC36C(=O)N37C(=O)CC37C(=O)N38C(=O)CC38C(=O)N39C(=O)CC39C(=O)N40C(=O)CC40C(=O)N41C(=O)CC41C(=O)N42C(=O)CC42C(=O)N43C(=O)CC43C(=O)N44C(=O)CC44C(=O)N45C(=O)CC45C(=O)N46C(=O)CC46C(=O)N47C(=O)CC47C(=O)N48C(=O)CC48C(=O)N49C(=O)CC49C(=O)N50C(=O)CC50C(=O)N51C(=O)CC51C(=O)N52C(=O)CC52C(=O)N53C(=O)CC53C(=O)N54C(=O)CC54C(=O)N55C(=O)CC55C(=O)N56C(=O)CC56C(=O)N57C(=O)CC57C(=O)N58C(=O)CC58C(=O)N59C(=O)CC59C(=O)N60C(=O)CC60C(=O)N61C(=O)CC61C(=O)N62C(=O)CC62C(=O)N63C(=O)CC63C(=O)N64C(=O)CC64C(=O)N65C(=O)CC65C(=O)N66C(=O)CC66C(=O)N67C(=O)CC67C(=O)N68C(=O)CC68C(=O)N69C(=O)CC69C(=O)N70C(=O)CC70C(=O)N71C(=O)CC71C(=O)N72C(=O)CC72C(=O)N73C(=O)CC73C(=O)N74C(=O)CC74C(=O)N75C(=O)CC75C(=O)N76C(=O)CC76C(=O)N77C(=O)CC77C(=O)N78C(=O)CC78C(=O)N79C(=O)CC79C(=O)N80C(=O)CC80C(=O)N81C(=O)CC81C(=O)N82C(=O)CC82C(=O)N83C(=O)CC83C(=O)N84C(=O)CC84C(=O)N85C(=O)CC85C(=O)N86C(=O)CC86C(=O)N87C(=O)CC87C(=O)N88C(=O)CC88C(=O)N89C(=O)CC89C(=O)N90C(=O)CC90C(=O)N91C(=O)CC91C(=O)N92C(=O)CC92C(=O)N93C(=O)CC93C(=O)N94C(=O)CC94C(=O)N95C(=O)CC95C(=O)N96C(=O)CC96C(=O)N97C(=O)CC97C(=O)N98C(=O)CC98C(=O)N99C(=O)CC99C(=O)N100C(=O)CC100C(=O)N101C(=O)CC101C(=O)N102C(=O)CC102C(=O)N103C(=O)CC103C(=O)N104C(=O)CC104C(=O)N105C(=O)CC105C(=O)N106C(=O)CC106C(=O)N107C(=O)CC107C(=O)N108C(=O)CC108C(=O)N109C(=O)CC109C(=O)N110C(=O)CC110C(=O)N111C(=O)CC111C(=O)N112C(=O)CC112C(=O)N113C(=O)CC113C(=O)N114C(=O)CC114C(=O)N115C(=O)CC115C(=O)N116C(=O)CC116C(=O)N117C(=O)CC117C(=O)N118C(=O)CC118C(=O)N119C(=O)CC119C(=O)N120C(=O)CC120C(=O)N121C(=O)CC121C(=O)N122C(=O)CC122C(=O)N123C(=O)CC123C(=O)N124C(=O)CC124C(=O)N125C(=O)CC125C(=O)N126C(=O)CC126C(=O)N127C(=O)CC127C(=O)N128C(=O)CC128C(=O)N129C(=O)CC129C(=O)N130C(=O)CC130C(=O)N131C(=O)CC131C(=O)N132C(=O)CC132C(=O)N133C(=O)CC133C(=O)N134C(=O)CC134C(=O)N135C(=O)CC135C(=O)N136C(=O)CC136C(=O)N137C(=O)CC137C(=O)N138C(=O)CC138C(=O)N139C(=O)CC139C(=O)N140C(=O)CC140C(=O)N141C(=O)CC141C(=O)N142C(=O)CC142C(=O)N143C(=O)CC143C(=O)N144C(=O)CC144C(=O)N145C(=O)CC145C(=O)N146C(=O)CC146C(=O)N147C(=O)CC147C(=O)N148C(=O)CC148C(=O)N149C(=O)CC149C(=O)N150C(=O)CC150C(=O)N151C(=O)CC151C(=O)N152C(=O)CC152C(=O)N153C(=O)CC153C(=O)N154C(=O)CC154C(=O)N155C(=O)CC155C(=O)N156C(=O)CC156C(=O)N157C(=O)CC157C(=O)N158C(=O)CC158C(=O)N159C(=O)CC159C(=O)N160C(=O)CC160C(=O)N161C(=O)CC161C(=O)N162C(=O)CC162C(=O)N163C(=O)CC163C(=O)N164C(=O)CC164C(=O)N165C(=O)CC165C(=O)N166C(=O)CC166C(=O)N167C(=O)CC167C(=O)N168C(=O)CC168C(=O)N169C(=O)CC169C(=O)N170C(=O)CC170C(=O)N171C(=O)CC171C(=O)N172C(=O)CC172C(=O)N173C(=O)CC173C(=O)N174C(=O)CC174C(=O)N175C(=O)CC175C(=O)N176C(=O)CC176C(=O)N177C(=O)CC177C(=O)N178C(=O)CC178C(=O)N179C(=O)CC179C(=O)N180C(=O)CC180C(=O)N181C(=O)CC181C(=O)N182C(=O)CC182C(=O)N183C(=O)CC183C(=O)N184C(=O)CC184C(=O)N185C(=O)CC185C(=O)N186C(=O)CC186C(=O)N187C(=O)CC187C(=O)N188C(=O)CC188C(=O)N189C(=O)CC189C(=O)N190C(=O)CC190C(=O)N191C(=O)CC191C(=O)N192C(=O)CC192C(=O)N193C(=O)CC193C(=O)N194C(=O)CC194C(=O)N195C(=O)CC195C(=O)N196C(=O)CC196C(=O)N197C(=O)CC197C(=O)N198C(=O)CC198C(=O)N199C(=O)CC199C(=O)N200C(=O)CC200C(=O)N201C(=O)CC201C(=O)N202C(=O)CC202C(=O)N203C(=O)CC203C(=O)N204C(=O)CC204C(=O)N205C(=O)CC205C(=O)N206C(=O)CC206C(=O)N207C(=O)CC207C(=O)N208C(=O)CC208C(=O)N209C(=O)CC209C(=O)N210C(=O)CC210C(=O)N211C(=O)CC211C(=O)N212C(=O)CC212C(=O)N213C(=O)CC213C(=O)N214C(=O)CC214C(=O)N215C(=O)CC215C(=O)N216C(=O)CC216C(=O)N217C(=O)CC217C(=O)N218C(=O)CC218C(=O)N219C(=O)CC219C(=O)N220C(=O)CC220C(=O)N221C(=O)CC221C(=O)N222C(=O)CC222C(=O)N223C(=O)CC223C(=O)N224C(=O)CC224C(=O)N225C(=O)CC225C(=O)N226C(=O)CC226

En una modalidad del proceso descrito en el esquema 5, las cadenas laterales de amina de los péptidos parcialmente protegidos 5c son enmascaradas por porciones de *tert*-butilcarbamoilo (Boc) y los péptidos resultantes reaccionan con cualquiera de los aldehídos PEG previamente descritos en solventes orgánicos tales como 1,2-dicloroetano (DCE) N,N-dimetil formamida (DMF) o mezclas de estos. La formación de iminas intermedias se puede acelerar mediante la adición de un agente deshidratante tal como los tamices moleculares empolvados 4°A. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1-24 horas, la imina resultante se reduce mediante la adición de 1-4 equivalentes de triacetoxi borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio.

En otra modalidad del proceso descrito en el esquema 5, en conjunto con cualquiera de las anteriores o siguientes modalidades, las reacciones con los péptidos parcialmente protegidos tales como 5c se puede conducir a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C. Preferiblemente, las reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c como se describe en los esquemas 5 se pueden conducir a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 50°C. Más preferiblemente, las reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c como se describe en el esquema 5 se pueden conducir a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C. La mayoría de las reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c como se describe en el esquema 5 se puede conducir a temperatura ambiente.

En otra modalidad el proceso descrito en el esquema 5, las cadenas laterales de amina de los péptidos parcialmente protegidos 5c se enmascaran mediante porciones terc-butilcarbamoil (Boc) y los péptidos resultantes reaccionan con cualquiera de los N-hidroxisuccinimida PEG previamente descritos o los reactivos PEG de p-nitrofenil éster en solventes orgánicos tales como 1,2-dicloroetano (DCE), N,N-dimetil formamida (DMF), diclorometano, N-metilpirolidina (NMP) o mezclas de estos. Los ésteres PEG activados pueden ser variedades monofuncionales o bifuncionales lineales de las cuales ambas están comercialmente disponibles de abastecedores tales como Nektar o NOF. Además, el éster activado PEG polifuncional ramificado, que contiene 3-6 hidroxisuccinimida o las presiones p-nitrofenil éster son especialmente útiles para preparar conjugados de la presente invención.

En otra modalidad el proceso descrito en el esquema 5, en conjunto con cualquiera de las modalidades anteriores o siguientes, las reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c se pueden conducir a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C con tiempos de reacción que varían desde aproximadamente 4 horas a aproximadamente 10 días. Preferiblemente, las reacciones con los péptidos parcialmente protegidos tales como 5c como se describe en el esquema 5 se pueden conducir a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 50°C con tiempos de reacción que varían desde aproximadamente 12 horas a aproximadamente 5 días. Más preferiblemente, las reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c, como se describe en el esquema 5 se pueden conducir a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 45°C con tiempos de reacción que varían desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 días. La mayoría de las reacciones con péptidos parcialmente protegidos tales como 5c, como se describe en el esquema 5 se pueden conducir a temperatura ambiente con tiempos de reacción que varían desde aproximadamente 1 a aproximadamente 4 días.

En otra modalidad del proceso descrito en el esquema 5, en conjunto con cualquiera de las modalidades anteriores o siguientes, la remoción de los grupos protectores con cadena lateral como se describe en el esquema 5 se puede conducir a una temperatura de aproximadamente menos 20°C a aproximadamente 60°C. Esta reacción se puede desarrollar en un solvente compatible tal como diclorometano utilizando entre aproximadamente 5% de ácido trifluoroacético (TFA) y 5% de TFA en volumen. Preferiblemente, la remoción del grupo protector mediado por ácido como se describe en el esquema 5 se puede conducir a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 40°C, utilizando

aproximadamente 10 a aproximadamente 25% de TFA en volumen. Más preferiblemente, la remoción del grupo protector mediado por ácido como se describe en el esquema 5 se puede conducir a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 25°C utilizando aproximadamente 10% a aproximadamente 20% de TFA en volumen en diclorometano. Más preferiblemente, la remoción del grupo protector mediado por ácido como se describe en el esquema 5 se puede conducir a una temperatura ambiente que utiliza aproximadamente el 20% en volumen en diclorometano.

En otra modalidad del proceso descrito en el esquema 5, en conjunto con cualquiera de las modalidades anteriores o siguientes, los productos 5d descritos en el esquema 4 pueden ser HPLC de fase inversa purificada, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio de ión o diálisis con membrana. Más preferiblemente, una combinación de dos o más de las técnicas de purificación anteriormente mencionadas se puede utilizar en combinación o secuencialmente para lograr los conjugados purificados de la presente invención.

En otra modalidad el proceso descrito en el esquema 5, en conjunto con cualquiera de las modalidades anteriores o siguientes, el método de purificación se puede conducir más de una vez.

Dervados También como se contempla aquí son los dervados de los péptidos y/o los péptidos conjugados de la presente invención. Tales dervados pueden adicionalmente mejorar la solubilidad, absorción, vida media biológica, y similares, de los péptidos conjugados con vehículo o PEG descritos aquí. Las porciones agregadas pueden eliminar alternativamente o atenuar cualquier característica

indeseable de los péptidos y/o péptidos conjugados descritos aquí. Ejemplos derivados incluyen péptidos vehículo o péptidos conjugados PEG en los cuales

1 El péptido y/o el péptido conjugado o alguna porción de ellos es cíclico. Por ejemplo, la porción de péptido de un péptido y/o péptido conjugado puede ser modificada para que contenga dos o más residuos de cisteína (por ejemplo en el enlazador peptídico), el cual podría ciclizar por formación de enlace de disulfuro. Para las citaciones a las referencias sobre la preparación de derivados ciclizados, ver WO 00/24782.

2 El péptido y/o péptido vehículo o péptido conjugado PEG es reticulado o convertido para ser capaz de reticularse entre moléculas. Por ejemplo, la porción de péptido de un péptido conjugado puede ser modificado para que contenga un residuo Cys y por lo tanto sea capaz de formar un enlace disulfuro intermolecular con una molécula similar.

3 Uno o más enlaces peptídico $[-C(O)NR-]$ (enlaces péptidos) se reemplaza por un enlace no peptídico. Enlaces no peptídicos ilustrativos son $[-CH_2-OC(O)NR-]$, $[-CH_2-carbamato]$, fosfonato, $[-CH_2-S(O)_2NR-]$, $[-CH_2-sulfonamida]$, $[-NHC(O)NH-]$ urea, $[-CH_2-amina\ secundana]$, y péptido alquilado $[-C(O)NR^a-]$ en donde R^a es un alquilo inferior.

4 El residuo de cisteína del terminal N de un péptido conjugado en X^1 puede ser sustituido con un grupo derivado del terminal N. Grupos de derivados de terminal N ilustrativos incluyen $-NHR^1$ en donde R^1 es monoalquilo.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para la reticulación de los péptidos conjugado vehículo o sus derivados funcionales a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros vehículos macromoleculares. Los agentes reticulados comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetilo)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxysuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1, 8-octano. Agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]-propioimidato producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en la presencia de luz. Alternativamente, las matrices reactivas insolubles en agua tales como bromuro de cianógeno-carbohidratos activados y los sustratos reactivos descritos en las Patentes Estadounidenses Nos. 3,969,287, 3,691,016, 4,195,128, 4,247,642, 4,229,537, y 4,330,440 son empleados para la inmovilización de proteína.

Los grupos carbohidratos (oligosacáridos) pueden ser sujetos convenientemente a sitios que son conocidos como sitios de glicosilación en las proteínas. Generalmente, los oligosacáridos enlazados en O son sujetos a los residuos serina (Ser) o treonina (Thr), mientras que los oligosacáridos enlazados por N son sujetos a residuos de asparagina (Asn) en donde ellos son parte de la secuencia Asn-Aaa-Ser/Thr, en donde Aaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Aaa es preferiblemente uno de los diecinueve ácidos de ocurrencia natural diferentes de la prolina. Las estructuras de los oligosacáridos enlazados en N o enlazados en O y los residuos de azúcar encontrados que cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que es comúnmente encontrado tanto en el ácido N-acetilneuramínico (referido como ácido siálico). El ácido siálico es usualmente el residuo terminal de oligosacáridos tanto enlazados en N y como

enlazados en O, y, por virtud de su carga negativa, pueden conferir propiedades ácidas al péptido conjugado glicosilado. Tal sitio puede ser incorporado en el enlazador de los péptidos conjugado vehículo de la invención. Tales sitios pueden ser adicionalmente glicosilados por procedimientos sintéticos o semi-sintéticos conocidos en la técnica.

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

A menos que se describa de otra manera aquí, la síntesis de péptidos y/o péptidos conjugados descritos aquí, incluyen la preparación de derivados de aminoácidos apropiados, su activación y acoplamiento para formar péptidos y métodos para la purificación de los péptidos y determinación de su pureza son incluidos en el cuerpo general del conocimiento de la química de péptidos, como generalmente se describió en Houben-Weyl "Methoden der Organischen Chemie" Vol 16, partes I & II, (1974) para la síntesis de fase de solución. Para la síntesis por el método de fase sólida, las técnicas adecuadas son también conocidas en la técnica e incluyen aquellas descritas en Merrifield, *Chem Polypeptides*, páginas 335-361 (Katsoyannis and Panayotis editors) (1973), Merrifield, *J Am Chem Soc*, Volume 85, página 2149 (1963), Davis et al, *Biochem Intl*, Volume 10, páginas 394-414 (1985), Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (1969), Patente Estadounidense No 3,941,763, Finn et al, *The Proteins* (3d edición), Volumen 2, páginas 105-253 (1976) y Erickson et al, *The Proteins* (Third Edition), Volumen 2, páginas 257-527 (1976). Un químico versado

en la técnica de la síntesis de péptidos sería capaz de sintetizar los péptidos descritos por métodos de solución estándar o por métodos manuales de fase sólida automáticos. A la síntesis de fase sólida es la técnica preferida para hacer péptidos individuales porque es efectiva en costo.

Composiciones Farmacéuticas

En general. La presente invención también suministra métodos para usar composiciones farmacéuticas de los péptidos de la invención y/o los péptidos conjugado vehículo de la invención, por ejemplo, en la prevención o tratamiento de la inflamación o del dolor (incluyendo, pero sin limitarse a, dolor inflamatorio e hiperalgesia asociada y alodinia). Los péptidos y/o los péptidos conjugados vehículo de la invención también tienen valor terapéutico para la prevención o tratamientos de otras condiciones dolorosas asociadas con o mediadas por la activación de B1, incluyendo pero sin limitarse a, síndrome de dolor talámico, diabetes, toxinas y quimioterapias, choque séptico, artritis, síndromes mezclados vascular y no vascular, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, desórdenes inflamatorios del intestino, desórdenes inflamatorios de los ojos, desórdenes inflamatorios o inestables de la vejiga, sonasís, complicaciones de la piel con componentes inflamatorios, quemaduras del sol, carditis, enfermedad inflamatoria del intestino, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades colágenas vasculares, condiciones inflamatorias crónicas, daño del tejido epitelial o disfunción del tejido epitelial, herpes simplex, dolor diabético neuropático, neuralgia post-herpética, causalgia, dolor simpáticamente mantenido, síndromes de deafferenciación, dolor de tensión, angina, migraña, dolor quirúrgico, perturbaciones de motilidad visceral en la respiración, genito unnanas,

regiones gastrointestinales o vasculares, hendas, quemaduras, rinitis alérgica, asma, reacciones alérgicas de la piel, pruritis, vitíligo, desórdenes generales gastrointestinales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, o vasomotoras o rinitis alérgica

La invención también suministra el uso de péptidos y/o péptidos conjugados vehículo de la presente invención para la prevención o tratamiento del dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte baja de la espalda, dolor por trauma, dolor quirúrgico, dolor que resulta de la amputación o absceso, causalgia, enfermedades demielinantes, neuralgia trigeminal, cáncer, alcoholismo crónico, infarto, síndrome de dolor talámico, diabetes, síndrome de deficiencia inmunoadquirida (SIDA) toxinas y quimioterapia, dolor general, migraña, dolor de grupo, síndromes mezclados vasculares y o vasculares, dolor de tensión, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, desórdenes inflamatorios del intestino, desórdenes inflamatorios de los ojos, desórdenes inflamatorios o inestables de la vejiga, sonaxis, complicaciones de la piel con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades colágenas vasculares, condiciones crónicas inflamatorias, dolor inflamatorio e hiperalgesia asociada y alodinia asociada, dolor neuropático e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor diabético neuropático, causalgia, dolor simpáticamente mantenido, síndromes de deafferenciación, asma, rinitis alérgica, daño de tejido epitelial o disfunción del mismo, herpes simplex, neuralgia post-herpética, perturbaciones de la motilidad visceral en la respiración, regiones genitourinarias gastrointestinales o vasculares, hendas, quemaduras, reacciones alérgicas de la piel, pruritis, vitíligo, desórdenes generales gastrointestinales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, y desórdenes bronquiales

De acuerdo con lo anterior, la presente invención también se relaciona con el uso de uno o más de los péptidos y/o péptidos conjugados vehículo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un desorden tal como dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la parte baja de la espalda, dolor por trauma, dolor quirúrgico, dolor que resulta de la apuntación o absceso, causalgia, enfermedades demielinantes, neuralgia trigeminal, cáncer, alcoholismo crónico, apoplejía, síndrome de dolor talámico, diabetes, síndrome de deficiencia inmunoadquirida (SIDA), toxinas y quimioterapia, dolor general, migraña, dolor agrupado, síndromes mezclados vasculares y o vasculares, dolor de tensión, inflamación general, artritis, enfermedades reumáticas, lupus, osteoartritis, desórdenes inflamatorios del intestino, desórdenes inflamatorios de los ojos, desórdenes inflamatorios o inestables de la vejiga, sonasis, complicaciones de la piel con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades colágenas vasculares, condiciones crónicas inflamatorias, dolor inflamatorio e hiperalgesia asociada y alodinia asociada, dolor neuropático e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor diabético neuropático, causalgia, dolor simpáticamente mantenido, síndromes de deafferenciación, asma, rinitis alérgica, daño de tejido epitelial o disfunción del mismo, herpes simplex, neuralgia post-herpética, perturbaciones de la motilidad visceral en la respiración, regiones genitourinarias gastrointestinales o vasculares, heridas, quemaduras, reacciones alérgicas de la piel, pruritis, vómito, desórdenes generales gastrointestinales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, y desórdenes bronquiales

Como se usa aquí, "tratamiento" o "tratar" es una enseñanza para obtener beneficios o resultados clínicos deseados. Para propósitos de esta invención, los

resultados beneficiosos o deseados clínicos incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes mejora o alivio de cualquier aspecto del dolor y/o la inflamación, incluyendo dolor agudo, crónico, inflamatorio, neuropático o post quirúrgico Para propósitos de esta invención, los resultados beneficiosos o clínicos deseados incluyen, pero sin limitarse a, uno o más de los siguientes incluyendo severidad disminuida, alivio de uno o más de los síntomas asociados con el dolor y/o la inflamación incluyendo cualquier aspecto del dolor y/o inflamación (tal como duración acortada del dolor y/o inflamación, y/o reducción de la sensibilidad del dolor o la sensación)

Tales composiciones farmacéuticas o medicamentos pueden ser para administración por inyección, u oral, pulmonar, nasal, transdérmica, u otras formas de administración En general, la invención involucra composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades efectivos de por lo menos un péptido y/o por lo menos un péptido conjugado vehículo de la invención (en cantidades efectivas para impedir, mejorar, eliminar el dolor o cualquiera otra de las condiciones médicas suministradas aquí) junto con diluyentes, excipientes preservativos, solubilizadores, emulsificadores, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables Tales composiciones incluye diluyentes de diversos contenidos de amortiguación (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fortaleza iónica, aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), anti-oxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), preservativos (por ejemplo, Timerosol, alcohol de bencilo) y sustancias para dar volumen (por ejemplo, lactosa, manitol), incorporación del material en preparaciones particuladas de péptidos conjugados vehículo poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc o en liposomas El ácido hialurónico puede también ser usado, y este puede tener el efecto de

promocionar duración sostenida en la circulación. Tales composiciones pueden adicionalmente influenciar el estado físico, la estabilidad, velocidad de la liberación in vivo, y velocidad de la clarificación in vivo de los péptidos conjugados vehículos de la presente invención. Ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^{ava} Edición, Mack Publishing Co., Easton, PA, páginas 1435-1712 (1990), que es incorporada aquí como referencia. Las composiciones pueden ser preparadas en forma líquida, o como un polvo seco (tales como forma liofilizada). Las formulaciones implantables de liberación sostenida son también contempladas, tal como formulaciones transdérmicas.

Formas de dosificación oral Se contemplan para uso aquí las formas de dosificación oral sólidas que son descritas generalmente en el capítulo 89 de las Ciencias Farmacéuticas de Remington, anteriormente mencionadas, que se incorporan aquí como referencia. Las formas de dosificación sólida incluyen tabletas, cápsulas, píldoras, tabletas, o tabletas en forma rombo, sellos o píldoras, también, la encapsulación liposomal o protenoide puede ser usadas para formular las composiciones presentes (tales como, por ejemplo, las microesferas protenoides reportadas en la Patente Estadounidense No. 4,925,673). La encapsulación liposomal puede ser usada, y los liposomas pueden ser derivatizados con diversos polímeros (ver, la Patente Estadounidense No. 5,013, 556). Una descripción de formas de dosificación sólidas posible se da en el capítulo 10 de Marshall, K., Modern Pharmaceutics, editado por G. S. Banker y C. T. Rhodes (1979), se incorpora aquí como referencia. En general, la formulación incluirá un péptido conjugado vehículo, lo mismo que ingredientes inertes que permitan la protección contra el ambiente estomacal y la liberación del péptido conjugado vehículo en el intestino.

También se ha contemplado específicamente las formas de dosificación oral del péptido y/o péptido conjugado vehículo de la invención misma. A este respecto, si es necesario, los péptidos y/o péptidos conjugados vehículos pueden ser modificados químicamente de modo que el suministro oral sea eficaz. También es posible usar una sal de un aminoácido alifático modificado, tal como N-(8-[2-hidroxibenzoilo]amino) caprilato de sodio (SNAC), como un vehículo para promover la absorción de los péptidos conjugados por vehículo de la invención. Ver la Estadounidense No. 5,792,451, titulada "Composiciones y métodos de Suministro de Drogas Orales".

Los péptidos y/o péptidos conjugados por vehículo de la invención pueden estar incluidos en la formulación como multiparticulados finos en la forma de gránulos o pepitas de un tamaño de partícula de cerca de un milímetro. La formulación del material para la administración de cápsula también puede ser como un polvo, o tapones ligeramente comprimidos o aún tabletas. La terapéutica podría ser preparada por compresión.

Colorantes y agentes saborizantes también pueden estar incluidos. Por ejemplo, el péptido y/o péptido conjugado por vehículo o cualquier derivado de los mismos puede ser formulados (tales como por liposoma o encapsulación de microesferas) y entonces ser contenidos adicionalmente dentro de un producto consumible, tal como una bebida refrigerada que contenga colorantes y agentes saborizantes.

Uno puede diluir o incrementar el volumen del péptido y/o y péptido conjugado por vehículo de la invención con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente, manitol α -lactosa, lactosa anhidrosa,

celulosa, sucrosa, dextrano modificado y almidón. Ciertas sales inorgánicas también pueden ser usadas como cargas, incluyendo trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

Se pueden incluir también desintegrantes en la formulación del terapéutico en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como desintegrantes incluyen, pero no se limitan a, almidón, incluyendo el desintegrante comercialmente disponible con base en almidón Explotab. Glicolato de sodio almidón, Amberlita, carboximetilcelulosa de sodio, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, piel de naranja, carboximetil celulosa ácido esponja natural y bentonita también pueden ser usados. Otra forma de desintegrantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Las gomas en polvo pueden ser usadas como desintegrantes y como aglomerantes, y estos pueden incluir gomas en polvo tales como agar, Baraya o tragacanto. El ácido algínico y sus sales de sodio también son útiles como desintegrantes.

Los aglomerantes pueden ser usados para sostener los componentes de la composición farmacéutica juntos para formar una tableta dura, y ellos incluyen materiales de productos naturales tales como acacia, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metil celulosa (MC), etil celulosa (EC) y carboximetil celulosa (CMC). La polivinil pirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) podrían ambas ser usadas en soluciones alcohólicas para granular el terapéutico.

Un agente anti-friccional puede estar incluido en la formulación para impedir el pegado durante el proceso de formulación. Los lubricantes pueden ser usados como capa entre el terapéutico y la pared de troquel, y estos pueden incluir, pero

no limitarse a ácido esteárico, que incluye sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. Los lubricantes solubles también pueden ser usados tales como sulfato de sodio laurilo, sulfato de magnesio laurilo, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

Los deslizantes pueden mejorar las propiedades de flujo del péptido conjugado con vehículo durante la formulación y para ayudar a la reorganización durante la compresión pueden agregarse. Tales deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.

Para ayudar a la disolución del péptido y/o del péptido conjugado con vehículo de la invención en un ambiente acuoso, un tensoactivo puede ser agregado como agente humectante. Tales tensoactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como sulfato de sodio laurilo, sulfosuccinato de dioctilo sodio y sulfonato de dioctilo sodio. Los detergentes catiónicos pueden ser usados y pueden incluir cloruro de benzalconio o cloruro de benzetonio. La lista de detergentes no iónicos que pueden ser incluidos en la formulación como tensoactivos: lauramacrogol 400, estearato de polioxilo 40, polioxietileno hidrogenado de aceite de castor 10, 50, y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso y sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. Estos tensoactivos pueden estar presentes en la formulación sea solos o en una mezcla en diferentes proporciones.

Aditivos también pueden estar incluidos en la formulación para promover la toma de los péptidos y/o el péptido conjugado con vehículo. Los aditivos tienen

potencialmente esta propiedad que incluye diversos ácidos grasos, tales como, por ejemplo, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico

La formulación de liberación controlada puede ser deseable. El péptido y/o péptido conjugado con vehículo de la invención puede estar incorporado dentro de una matriz inerte que permite la liberación sea por mecanismos de difusión o lixiviado, por ejemplo, gomas. Las matrices que se degeneran lentamente también pueden ser incorporadas dentro de la formulación, por ejemplo, alginatos o polisacáridos. Otra forma de una liberación controlada del péptido y/o el péptido conjugado con vehículo de la invención es por un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), es decir, la droga está encerrada en una membrana semi permeable que permite que entre agua y empuje la droga hacia afuera por una abertura única pequeña debido a los efectos osmóticos. Algunos recubrimientos entéricos también tienen un efecto de liberación retardada.

Formas de suministro pulmonar También se contempla aquí el suministro pulmonar de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. El péptido y/o el péptido conjugado con vehículo (o derivados de ellos) es suministrado a los pulmones de un mamífero cuando se inhala y atraviesa a través del recubrimiento epitelial del pulmón hacia la corriente sanguínea. Los reportes que se relacionan con el suministro pulmonar de macromoléculas que pueden ayudar a este respecto incluyen Adjei et al., Pharma Res., Volumen 7, páginas 565-569 (1990), Adjei et al., Internat'l J. Pharmaceutics, Volumen 63, páginas 135-144 (1990) (acetato de leuprolida), Braquet et al., J. Cardiovasc. Pharmacol., Volumen 13 (suppl. 5), s. 143-146 (1989) (endotelín-1), Hubbard et al., Annals Int. Med., Volumen 3, páginas 206-12 (1989) (α 1-antitripsin), Smith et al., J. Clin. Invest., Volumen 84, páginas 1145-1146 (1989) (α 1-proteinasa), Oswein et al.,

"Aerosolization of Proteins", Proc Symp Resp Drug Delivery II, Keystone, Colorado (1990) (hormona del crecimiento humano recombinante), Debs et al, J Immunol, Volumen 140, páginas 3482-3488 (1988) (interferón- γ y factor α de la necrosis de tumor), y la Patente Estadounidense No 5,284,656 (factor de granuloso estimulante de colonias)

Se contempla para uso en la práctica de la invención un amplio rango de dispositivos mecánicos diseñados para el suministro pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a nebulizadores, inhaladores de dosis medida, e inhaladores de polvo, todos ellos son comunes y familiares para aquellos versados en la técnica. Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles adecuados para la práctica de la invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc, St Louis, Missouri, el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado, el inhalador de dosis medida Ventolin, fabricado por Glaxo Inc, Research Triangle Park, Carolina del Norte, y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp, Bedford, Massachusetts.

Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para el suministro de los péptidos y/o péptidos conjugados con vehículos descritos y/o derivados de ellos. Típicamente, cada formulación es específica al tipo de dispositivo empleado y pueden involucrar el uso de un material propelente apropiado, en adición al diluyente, excipientes adyuvantes y/o vehículos útiles en la terapia.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para aquellas composiciones pulmonares incluyen carbohidratos tales como trealosa, manitol, xilitol, sucrosa,

lactosa, y sorbitol. Otros ingredientes para uso en formulaciones pueden incluir DPPC, DOPE, DSPC y DOPC. Tensoactivos naturales o sintéticos también pueden ser usados. El PEG puede ser usado (aun aparte de su uso en derivatizar el péptido). Dextranos, tales como ciclodextran, sales biliales, celulosa y derivados de celulosa también pueden ser usados. Los aminoácidos derivados de celulosa también pueden ser usados. Los aminoácidos pueden ser usados, tales como en una formulación de amortiguación.

Adicionalmente, el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de vehículo también se contempla.

Las formulaciones adecuadas para uso con un nebulizador, sea del tipo chorro o ultrasónico, típicamente comprenderá el péptido y/o el péptido conjugado con vehículo descrito disuelto en agua en una concentración de cerca de 0.1 a 25 miligramos (mg) de agente biológicamente activo por mililitro (ml) de solución. La formulación también puede incluir un amortiguador y un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización del péptido y la regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador puede también contener un tensoactivo, para reducir o impedir la agregación inducida en la superficie de la proteína causada por la atomización de la solución en la formación del aerosol.

Las formulaciones para uso con un dispositivo inhalador de dosis medida generalmente comprenderán un polvo finamente dividido que contiene el péptido y/o el péptido conjugado con vehículo descritos suspendidos en un propelente con la ayuda de un tensoactivo. El propelente puede ser cualquier material convencional empleado para este propósito, tal como un clorofluorocarbono, un hidroc fluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono, un hidrocarbono, incluyendo

trclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluorometanol, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de ellos. Los tensoactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitan y lecitina de soya. El ácido oleico también puede ser útil como un tensoactivo.

Las formulaciones para dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene los péptidos y/o los péptidos conjugados con vehículo descritos y también puede incluir un agente de abultamiento tal como lactosa, sorbitol, sucrosa, manitol, trealosa, o xilitol en cantidades que faciliten la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo 50 a 90% en peso de la formulación.

Formas de suministro nasal El suministro nasal del péptido y/o de los péptidos conjugados con vehículo también se contemplan. El suministro nasal permite el pasaje del péptido y/o de los péptidos conjugados con vehículo de la invención a la corriente sanguínea directamente después de administrar el producto terapéutico en la nariz, sin la necesidad de la deposición del producto en el pulmón. Las formulaciones para suministro nasal incluyen aquellas con dextran o ciclodextran. El suministro vía el transporte a través de otras membranas mucosas también se contempla.

Suministro de bomba En ciertas modalidades de la presente invención, el suministro localizado de los péptidos y/o los péptidos conjugados de la presente invención se contempla para tratamiento o prevención de desórdenes mediados por B1. Un método de suministro localizado contemplado por la invención es la inyección del agente en un sitio local en el cual el agente actúa.

Otro método para suministro localizado incluye la inserción de un catéter para dirigir la droga o drogas al sitio del cuerpo deseado, usando una bomba para impulsar una droga o las drogas por el catéter. Bombas para droga que se llevan externamente con un catéter implantado internamente son bien conocidas por aquellos versados en la técnica.

Otro método adicional para suministro localizado incluye dispositivos de suministros de droga implantables. Las bombas implantables han sido desarrolladas para solucionar las desventajas de las técnicas que usan bomba externa y sistemas de catéter que son bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Las bombas de suministro de droga implantables frecuentemente incluyen un recipiente para almacenar la droga, una puerta de inyección para permitir la inyección de preparaciones de droga fresca lo mismo que la remoción de la droga antigua a intervalos regulares desde el recipiente, y opcionalmente un catéter para suministrar la droga al sitio deseado. Los dispositivos implantables preferidos incluyen, pero no se limitan a, el implante Duros (Alza Corporation, Mountain View, CA), el Sistema de Infusión SynchroMed I o II (Medtronic, Inc., Minneapolis) y similares.

Adicionalmente (o alternativamente), la presente invención suministra el péptido y/o el péptido conjugado para uso en cualquier de las diversas formulaciones de liberación lenta o sostenida o formulaciones de micropartícula previamente mencionados aquí anteriormente y/o conocidos por el artesano versado.

Dosificaciones Las dosificaciones efectivas de los péptidos y/o los péptidos conjugados de la invención para ser administrados pueden determinarse por

medio de procedimientos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica que usan tales parámetros como vida media biológica, biodisponibilidad, y toxicidad. En modalidades preferidas un rango de dosificación efectiva es determinado por aquel versado en la técnica usando datos de rutina en estudios in vitro o in vivo bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Por ejemplo, los ensayos de cultivo celular in vitro, tales como el ensayo ilustrativo descrito en el Ejemplo 6 más adelante suministrará datos de los cuales una persona versada en la técnica puede determinar fácilmente la concentración media inhibitoria (IC) o la concentración media efectiva (EC) del péptido o del péptido conjugado necesario para bloquear alguna cantidad de actividad inducida por B1 (por ejemplo, 50%, IC₅₀, o 90% IC₉₀). Dosis apropiadas pueden entonces ser seleccionadas por aquellos versados en la técnica usando datos farmacocinéticos de uno o más modelos animales de rutina, tales como los datos farmacocinéticos ilustrativos descritos en el Ejemplo 9, más adelante, de modo que una concentración mínima de plasma (C_{min}) del péptido es obtenida la cual es igual a o excede el valor IC determinado. El régimen de dosificación involucrado en un método para tratar la enfermedad involucrada o el desorden involucrado será determinado por el médico que atiende, considerando diversos factores que modifican la acción del agente terapéutico, tales como la edad, condición, peso del cuerpo, sexo y dieta del paciente, la severidad de la condición que está siendo tratada, el tiempo de administración, y otros factores clínicos. Generalmente, el régimen de dosis debería estar en el rango de 1 0-10000 microgramos (μ g) del péptido y/o del péptido conjugado con vehículo por kilogramo (kg) del peso del cuerpo, preferiblemente 1 0-1000 μ g por kilogramo del peso del cuerpo, y más preferiblemente 1 0-150 μ g por kilogramo de peso del cuerpo.

Terapia de combinación En otro aspecto, la presente invención incluye un método para tratar (o, en otras modalidades, prevenir) el dolor y/o la inflamación o cualquier condición o desorden asociado con la activación de B1, que comprende administrar una cantidad de péptido y/o el péptido conjugado de la presente invención en una cantidad de un NSAID. El término "NSAID" se refiere a un compuesto anti-inflamatorio no esteroide. Las cantidades relativas y proporciones del antagonista de péptido y/o del antagonista de péptido conjugado y NSAID pueden variar. En algunas modalidades suficiente del péptido y péptidos y/o los péptidos conjugados serán administrados de modo que se le permita la reducción de la dosis normal de NSAID requiendo para efectuar el mismo grado de mejoramiento del dolor o inflamación. En algunas modalidades, suficiente de los péptidos y/o los péptidos conjugados de la presente invención serán administrados de modo que se permita la reducción de la dosis normal de NSAID requenda para efectuar el mismo grado de mejoramiento de dolor o inflamación por lo menos cerca del 5%, por lo menos cerca del 10%, por lo menos cerca del 20%, en por lo menos cerca del 30%, por lo menos cerca del 40%, por lo menos cerca del 50%, por lo menos cerca del 60%, por lo menos cerca del 70%, por lo menos cerca del 80%, o por lo menos cerca del 90%, o más. Esta reducción puede ser reflejada en términos de cantidad administrada en una administración dada y/o cantidad administrada durante un periodo de tiempo dado (frecuencia reducida).

En otro aspecto, la invención suministra métodos para promover el tratamiento del dolor o inflamación con NSAID que comprende administrar una cantidad efectiva de un NSAID en conjunto con una cantidad efectiva de por lo menos un péptido y/o por lo menos un péptido conjugado de la presente invención. Como se usa aquí, "administración en conjunto" también significa involucrar cualquier circunstancia en donde un NSAID y un péptido y/o péptido

conjugado de la presente invención son administrados en una cantidad efectiva a un individuo "Administración en conjunto", como se usa aquí, comprende administración simultánea y/o administración a diferentes tiempos. La administración en conjunto también involucra la administración como una coformulación (es decir el péptido y/o el péptido conjugado de la presente invención y el NSAID están presentes (combinados) en la misma administración) y/o administraciones como administraciones separadas. Se entiende que el péptido o péptidos y/o péptidos conjugados de la presente invención y por lo menos un NSAID pueden ser administrados en diferentes frecuencias de dosificación y/o intervalos de dosificación. Por ejemplo, un péptido conjugado de la presente invención puede ser administrado semanalmente, mientras un NSAID puede ser administrado más frecuentemente. Se entiende que el péptido o los péptidos y/o péptidos conjugados de la presente invención y el NSAID pueden ser administrados usando la misma ruta de administración o diferentes rutas de administración y que diferentes regímenes de dosificación pueden cambiar durante el curso de la administración o administraciones. La administración puede aun ser dada antes del establecimiento del dolor o de la inflamación. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención suministra métodos para tratar, reducir la incidencia de, paliar y/o retardar el desarrollo o progresión del dolor y/o inflamación en un individuo, dichos métodos comprenden administrar una cantidad efectiva de por lo menos un péptido y/o por lo menos un péptido conjugado de la presente invención en conjunto con una cantidad efectiva de por lo menos NSAID. Tales métodos incluyen tratar o prevenir cualquier dolor y/o inflamación de cualquier etiología, incluyendo dolor y/o inflamación en donde el uso de un NSAID es generalmente prescrito. Tales métodos son también adecuados para tratar o prevenir cualquier condición o desorden previamente mencionado aquí o de aquí en adelante como que es mediado por o asociado con activación de B1. En algunas modalidades, el

dolor y/o la inflamación es dolor post-quirúrgico En algunas modalidades, el dolor y/o la inflamación están asociados con quemaduras o heridas En otras modalidades, el dolor y/o la inflamación están asociados con artritis reumatoide En otras modalidades, el dolor y/o la inflamación están asociados con osteoartritis En otras modalidades, el dolor y/o la inflamación están asociados con neuralgia post herpética En algunas modalidades, el NSAID seleccionado del grupo que consiste de aspirina, acetaminofén, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, naprosina, diclofenac, cetoprofeno, tolmetin, eslindac, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, diflunisal, Rufenisal, piroxim, sudoxicam, isoxicam, celecoxib, rofecoxib, DUP-897, flosulida, meloxicam, ácido 6-metoxi-2 naftilacético, MK-966, nabumetona, nimesulida, NS-398, SC-5766, SC58215, T-614 o combinaciones de ellos

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos son presentados para propósitos ilustrativos solamente y no tienen el propósito, ni deberían ser interpretados como limitativos de la invención de ninguna manera Estos versados en la técnica podrán apreciar que se pueden hacer modificaciones y variaciones de los compuestos descritos aquí sin violar el espíritu o alcance de la presente invención Los compuestos de acuerdo con la invención pueden ser sintetizados de acuerdo con uno o más de los siguientes métodos Debe notarse que los procedimientos generales son mostrados a medida que se relaciona con la preparación de los compuestos que tiene estereoquímica no especificada Sin embargo, tales procedimientos son generalmente aplicables a aquellos compuestos de una estereoquímica específica, por ejemplo, en donde la estereoquímica a cerca de un grupo es (S) o (R) Adicionalmente, los compuestos tienen una estereoquímica (por ejemplo, ((R))

pueden ser utilizados frecuentemente para producir aquellos que tienen estereoquímica opuesta (es decir, (S)) usando métodos bien conocidos, por ejemplo, por inversión

Ejemplo 1 Síntesis y purificación de antagonistas del Péptido receptor de B1 y el Péptido Receptor de B1 Conjugado por PEG

Diversos péptidos de la invención se han sintetizado usando técnicas de síntesis bien conocidas en la técnica. Un método preferido de sintetizar diversos péptidos de la invención usa una estrategia Fmoc con activación de carbodiimida como se describe más adelante.

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

El Fmoc-aminoácido (3 a 4 equivalentes) se disuelve en una mezcla de DCM/NMP (NMP o DMF se usan para ayudar a la disolución completa). Una solución de N-hidroxibenzotriazol (HOBt, igual equivalente al aminoácido) en NMP se agrega a la solución de aminoácido. Una solución de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, mismo equivalente al aminoácido) en DCM se agrega a la solución de aminoácido. La solución se mezcla durante aproximadamente 20 minutos, la solución ácida activada entonces se agrega a la resina (si se requiere, los precipitados se remueven antes de la adición). La reacción se agita hasta que la resina es negativa para el ensayo de ninhidrina. Luego de completar el acoplamiento, la resina se recolecta y se lava con DMF varias veces.

Parte 2 Se remueve el Fmoc de terminal N del péptido-resina

La resina de peptídico protegida por Fmoc se trata con piperidina/DMF (2/8) durante 3 minutos. La resina se drena y el tratamiento se repite durante 15 minutos. La resina se lava con DMF y luego con DCM varias veces. La resina se seca al aire y en la siguiente etapa hay partición del péptido desde la resina como se describe en la etapa 3.

Parte 3 División del TFA y desprotección

La resina secada de la parte 2 se coloca en un frasco y se agrega un cóctel de división de resina de 10 a 25 mL/g (95% TFA, 2.5% agua, 1.5% de trisopropilsilano y 1% de etanoditol). Después de agitar la reacción durante 3 a 4 horas, la resina se remueve por filtración bajo presión reducida y lavada dos veces con TFA. Los filtrados combinados se concentraron a aproximadamente 205 por evaporación giratoria bajo presión reducida. El líquido se enfría a -50° C, y se precipita con un volumen de 10 veces de éter seco frío. El precipitado se recolecta. El péptido se disuelve entonces en una mezcla de agua/acetonitrilo que contiene 0.5% de TFA y se liofiliza. El producto crudo entonces se purifica usando C18 HPLC, en un gradiente de 10% de acetonitrilo/0.1% de TFA en agua a 50% acetonitrilo/0.1% TFA en agua. Para 1 g de producto crudo, una columna C18 de 250 x 50 mm se usa a una velocidad de flujo de 90 mL/mina sobre un preparado Agilent de HPLC con detección de longitud de onda dual en 215 y 254 nm. La inyección se fracciona y cada fracción se analiza por espectrometría de masa. Los tubos se agruparon con base en la especificación de masa, se concentraron bajo presión reducida para remover el acetonitrilo y se liofilizan para obtener los antagonistas del péptido B1 como polvos blancos. La caracterización se lleva a cabo por HPLC-MS y determinación de masa Maldi-TOF.

Vanos péptidos conjugados por PEG de la invención se prepararon como sigue

Vanos antagonistas de péptidos receptores de bradiquinina B1 activos seleccionados del grupo que consiste de la ID de SEC No 5-60) se sintetizaron con diferentes enlazadores peptídico en el N-terminal, y cada uno contiene una cisteína penúltima usando los métodos anteriormente mencionados (por ejemplo, la ID de SEC No 27-41) Estos análogos de péptido se derivaron con tamaños diferentes y configuraciones diferentes de poli (etilenglicol) (PEG) por acoplamiento dirigido a sitios del polímero activado por maleimida en el tiol de la cisteína de terminal N de los análogos del péptido usando, por ejemplo, el método A o el método B descritos más adelante Los conjugados de péptido por PEG resultantes se purificaron por cromatografía de intercambio iónico, se concentran por liofilización o diafiltración y dializados en amortiguadores antes de los bioensayos in vitro e in vivo

Método A

Los péptidos conjugados por PEG se preparan haciendo reaccionar una cisteína que contiene el péptido con una PEG-maleimida en 50 mM de NaH_2PO_4 , 5 mM de EDTA, pH 6.5 a 7.5 – 5 mg/ml de péptido y una estequiometría de reacción de 1.2 veces molar en exceso de maleimida tiol La reacción se agita a temperatura ambiente (20 a 25° C) durante 1 a 1.5 h Una vez completa la reacción se calma con 10 veces molar en exceso de β -mercaptoetanol (β -ME) maleimida y se le permite agitarse durante 30 a 60 minutos adicionales a temperatura ambiente

El progreso de la reacción se monitorea usando HPLC de fase inversa (RP-HPLC) por la inyección de 5 µl de la reacción a una columna C4 de 5 micrones de 4.6x250 mm (Grace Vydac, Columbia, MD, cat No # 214TP54). El péptido no reaccionado y el conjugado de péptido por PEG son eluidos con un gradiente de acetonitrilo lineal de 5 a 90% en 0.1% de ácido trifluoroacético. Típicamente, >90% del análogo de péptido es consumido en la reacción.

Los polímeros de PEG activados por maleimida lineales (peso molecular=5 kD o 20 kD, PD=1.01-1.02) se suministraron por Shearwater Corp. o NOF Corp. (Toyko, Japón).

Purificación.

Los péptidos conjugados por PEG se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico usando columnas HP SP Sepharosa (Amersham Biosciences) pre-equilibradas con 10 mM de NaOAc, 20% de EtOH, pH 4. Antes de cargarlas, las mezclas de reacción se diluyeron 10 veces con 20% de EtOH y el pH se ajusta a 3.5 con ácido acético glacial. Las mezclas de reacción diluidas se cargaron a una columna dimensionada apropiadamente de modo que una proporción de péptido/resina de 2.5 mg/ml no se excede.

La columna entonces se lava con dos volúmenes de columna (CV) de 10 mM de NaOAc, 20% de EtOH, pH 4 y eluidas con un gradiente de NaCl de 0 a 200 mM lineal en 10 mM de NaOAc, 20% de EtOH, pH 4 durante 10 a 20 CV. El péptido no modificado y el conjugado de péptido por PEG se detectaron por medio de monitorear la absorbancia en 254 nm o 220 nm. Bajo estas condiciones el

exceso de PEG y de β -ME se lava en fracción a través de flujo no unido, el conjugado eluido en un pico amplio iniciando en ~50 mM de NaCl y el péptido libre fue bien resuelto, eluyendo en ~200 mM de NaCl

Las fracciones del pico eluido se evalúan por RP-HPLC y basadas con base en la homogeneidad y los tiempos de retención consistentes con los conjugados de péptido por PEG. El pico conjugado agrupado se concentra por secado, luego se reconstituye en agua y se dializa contra el amortiguador. Alternativamente se puede usar la diafiltración para concentrar e intercambiar el amortiguador en el conjugado.

Los agrupados finales de conjugado de péptido por PEG se analizaron por RP-HPLC y fueron típicamente aproximadamente 98% de conjugado. La composición conjugada y las concentraciones se determinaron por una combinación de análisis de aminoácido, secuenciamento de péptido, y espectroscopia de absorbancia.

La estabilidad de la solución de los compuestos representados por 1c en el Esquema 1 se monitorearon a temperatura ambiente en una salina amortiguada de fosfato con pH= 7.2 (PBS) durante el tiempo usando el método CEX descrito anteriormente (Figura 1 (A)). El compuesto 1c muestra una conversión rápida a 1d lo mismo que a dos productos resultantes de la hidrólisis de la parte succinimida (estructuras determinadas por una combinación de IR, MS/MS y experimentos NMR).

Método B

MPEG – maleimida (1.0 eq) fue disuelta a 30 ° C en MeOH anhidroso en un frasco de fondo redondo y tres cuellos equipado con un agitador mecánico, probeta de temperatura, y una entrada de N₂. Luego de la disolución total de la MPEG – maleimida, un péptido que contiene un residuo de cisteína en el terminal N (1.3 eq) fue agregado dentro de la solución clara y agitado a temperatura ambiente durante 3h. El HPLC fase inversa muestra la desaparición del MPEG – maleimida y el nuevo pico para el aducto de 3-sulfanil-succinimida inicial. Luego, diez equivalentes de diisopropil-etilamina (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO) se agregan a la solución y se agitan a 25 ° C durante por lo menos 24 horas. La reacción fue monitoreada por cromatografía de intercambio iónico usando TOSHAAS SP-5PW (20 µm) como fase estacionaria. El análisis CEX indicó más de 98% de conversión con menos de 1.5% del aducto de 3-sulfanil-succinimida restante. Butil metil éter terciario (TBME) fue agregado (dos veces el volumen de metanol usado en la reacción) y la solución nubosa resultante fue agitada a temperatura ambiente durante una hora. El precipitado blanco fue filtrado y retirado y secado bajo vacío a temperatura ambiente durante la noche para proporcionar el producto ligado a 6-metil-carbamoyl-5-oxo-tiomorfolina-3-carboxamida crudo (1d).

Purificación

El producto crudo fue purificado por RP-HPLC usando el sistema MeOH-H₂O-AcOH (fase estacionaria como C18 YMC ODS NQ) para proporcionar el producto enlazado 6-metil-carbamoyl-5-oxo-tiomorfolina-3-carboxamida con una pureza mayor a 98% por cromatografía de fase inversa analítica. Las fracciones puras fueron combinadas y concentradas hasta el secado bajo vacío y el residuo blanco resultante fue disuelto en cantidad mínima de MeOH caliente.

(aproximadamente 30 ° C) suficiente para dar una solución clara y luego tratada con TBME (doble vez en volumen de MeOH usado) La solución nubosa resultante fue agitada a temperatura ambiente durante una hora y el precipitado fue filtrado y retrado, secado bajo vacío a temperatura ambiente durante por lo menos 16 horas El producto puro (1d) es obtenido como un color blanco en una producción general de 74% con mayor a 98% de CEX y pureza RPC La composición conjugada y e el contenido de péptido fueron determinados por una combinación de análisis de aminoácido, secuenciamiento de péptido, métodos RMN multinucleares y espectroscopia de absorbancia La estabilidad de la solución del compuesto 1d fue monitoreada a temperatura ambiente en ph=7 en una salida amortiguada posfosfato (PBS) fue monitoreado durante el tiempo usando el método CEX descrito anteriormente Este compuesto probó ser más estable significativamente, sin cambios significativos que se hayan notado durante 6 días

La fase inversa analítica (RP) y la cromatografía de intercambio catiónico (cex) sobre sistemas HPLC Agilent 1100 con arreglo de diodos o detectores de longitud de onda variable y auto muestreadores termo establecidos Las condiciones cromatográficas estándar se delinean

1 Columna Condiciones del método RP-HPLC YMC ODS-AQ, 3µm, 120 Å, 4.6 x 100 mm

Temperatura de la columna	40 ° C	
Fases móviles	A) 0.1% TFA in agua	
	B) 0.1% TFA en MeOH	
Velocidad de flujo	1.1 ml/min	
Gradiente	Tiempo	%B

	0	5
	10	40
	30	95
	35	95
	35 1	5
	40	5
Detección	UV at 220 nm	
Volumen de Inyección	20 µL o 50 µL dependiendo de la concentración De la muestra	
Concentración de la muestra	2 5 a 10 mg/ml	
Diluyente de la muestra	PBS de Dulbecco y otros amortiguadores usados En los estudios de estabilidad	

2 Método de cromatografía de Intercambio catiónico analítico general

Columna	TOSOH, TSK-GEL, SP-5PW, 10µm, 7 5x75 mm	
Temperatura de columna	25 ° C	
Fases móviles	A) 20 Nm Na H ₂ PO ₄ en agua/EtOH (8 2) Ph' 3 5 B) 20 Nm Na H ₂ POy 0 5 M NaCl en agua/EtOH (8 2), Ph 3 5	
Velocidad del flujo	1 0 ML / min	
Gradiente	Tiempo	B%
	0	0
	3	0
	25	45

	40	100
	45	100
	45 1	0
	50	0
Detección	UV at 220 nm	
Volumen de inyección	10 a 50 µL dependiendo de la concentración	
	De la muestra	
Concentración de la muestra	2 5 a 10 mg/ml	
Diluyente de la muestra	PBS de Dulbecco y otros amortiguadores usados	
	En los estudios de estabilidad	

Ejemplo 2 Síntesis o Purificación de los Antagonistas del Péptido Receptor de B1 Conjugado por PEG usando Tioésteres de PEG

Los péptidos conjugados por PEG fueron preparados por medio de hacer reaccionar un péptido que contiene cisteína con PEG-maleimida en 50 Nm Na HPO₄ 5 Nm de EDTA, Ph 7 a 2 5-5 mg/ml de péptido y una estequiometría de reacción de 1 2 veces de exceso molar de maleimida tiol la reacción fue agitada a temperatura ambiente (20-25 ° C) durante 18 a 26 horas Una vez completa, la reacción es calmada con 10 veces exceso molar de β-mercaptoetanol (β-ME) Maleimida y se le permitió agitarse durante 30 a 60 minutos adicionales a temperatura ambiente Las reacciones fueron purificadas como se describió por el método A en el ejemplo 1 anterior

Ejemplo 3 Síntesis y Purificación de Antagonistas del Péptido Receptor B1 Conjugado por PEG usando Tioésteres de PEG o Yodoacetatos

Los péptidos conjugados PEG fueron preparados por medio de hacer reaccionar un péptido que contiene un residuo de cisteína N en el terminal con PEG-OPTE (orto-píndil tio ester) en 50 mM de Na HPO₄ y 5 mM de EDTA, Ph 7 a 2.5-5 mg/ml de péptido y una estequiometría de reacción de 1.2 veces exceso molar de PEG activado péptido. La reacción fue agitada a temperatura ambiente (20 a 25 ° C) durante 18 a 26 horas. Una vez completa, la reacción es calmada con 10 veces exceso molar de cisteína exceso de reactivo de PEG y se le permitió agitarse durante 30 a 60 minutos adicionales a temperatura ambiente. Las reacciones fueron purificadas como se describió por el método A en el ejemplo 1 anterior.

Alternativamente, PEG-iodoacetamida puede ser usado como se describió anteriormente para formar conjugados en los cuales la parte de PEG queda sujeta por medio de un enlace de tio éter (esquema 3). En este caso 1.5 equivalentes molares de la reacción de PEG activada se usa y el tiempo de reacción se incrementa a 24 horas, la reacción se calma con 10 equivalentes molares de β-mercaptoetanol como se describió en los ejemplos anteriores.

Ejemplo 4 Síntesis y purificación de antagonistas del péptido receptor B1 conjugado por PEG usando propionaldehído PEG

Los antagonistas de péptido B1 tales como cualquiera de las secuencias ID NOS 5-60 Y 27-41 pueden ser modificadas en terminal N selectivamente con PEG usando el método descrito en la patente estadounidense 5 824 784 (que se incorpora aquí como referencia en su totalidad). Por ejemplo, el péptido que se muestra en la ID de SEC No ID NO 6 (245 mg, 0.14 mmol) fue disuelto en 10ml

de una solución que contiene 100 mM de NaH_2PO_4 y 60 mM de NaCNBH_3 . La mezcla fue enfriada a 4°C con sobre agitación y tratada con 2.35 g de propionaldehído MPEG 20K (Néctar Therapeutics, Huntsville, AL). La mezcla fue agitada durante tres días, luego purificada por RP y cromatografía CEX como se describe en el método B del ejemplo 1.

Alternativamente las funcionalidades reactivas de la amina que contiene los PEG puede reaccionar con antagonistas de péptido del B1 protegidos de acuerdo con los métodos registrados en el esquema 5. Siguiendo a la reacción de conjugación, los grupos protectores de cadena lateral son divididos utilizando métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica de síntesis de péptido de fase sólida y solución, y las construcciones de PEG-péptido resultantes son purificadas como se describió anteriormente. Los PEG aldehídos multifuncionales (de 3 a 6 grupos reactivos) también pueden ser hechos reaccionar con cantidades de exceso molar de péptidos protegidos para proporcionar construcciones de PEG multivalentes en las cuales los múltiples péptidos son ligados o sujetos de una manera definida regio químicamente y estequiométricamente.

Ejemplo 5 Síntesis y purificación de antagonistas de péptido de receptor B1 conjugados por PEG usando PEG N hidroxil-succinimidas

Los antagonistas de péptido receptores tales como cualquiera de las ID de SEC No. 1-60 pueden ser pegilados selectivamente sobre un terminal N específico o átomo de nitrógeno de cadena lateral usando parcialmente antagonistas de péptido B1 protegidos de acuerdo con los métodos ilustrados en el esquema 5. Por ejemplo una solución de decapeptido parcialmente (1.43 g, 1.025 mmol) en 2.5 ml de DMF anhidroso fue combinada con 3.5 g (0.18 mmol) de

PTE-200GS de Sunbngth (20 KD 4-brazos de succinimidilgluterato, NOF, Tokio, Japón) y 10 ML de diisopropilamina 25 ml de diclorometano. La solución sin color resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 2 días y entonces evaporada a presión reducida. El residuo resultante fue disuelto en 25 ml de agua desionizada y colocado en una membrana de diálisis de corte de 10 000 de peso molecular (Pierce, Rockford IL, USA). El compuesto fue dializado contra agua durante 24 horas (tres cambios de amortiguador), luego liofilizado para proporcionar el producto de PEG tetravalente protegido. El sólido blanco resultante fue disuelto en 60 ml de diclorometano y tratado con 20 ml de TFA anhidroso. Después de agitación a temperatura ambiente durante dos días la mezcla de reacción fue evaporada a presión reducida y luego disuelta en dializado como se explicó anteriormente. El material dializado fue liofilizado y luego purificado por cromatografía de intercambio iónico como se describió previamente para proporcionar el producto tetravalente como un sólido blanco. De una manera similar las partes de 1-6 succinimidil gluterato que contienen los PEG puede ser usada para preparar construcciones mono o poli funcionales.

Tabla 4a Péptido X'

ID de SEC No:	Secuencia de Péptido X'
27	{N} CCGGKRPPGFSPL {C}
28	{N} CCGGGGKRPPGFSPL {C}
29	{N} CCGGGGKRPPGFSPL {C}
30	{N} CCGGGGKRPPGFSPL {C}
31	{N} CG-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-KRPPGFSPL {C}
32	{N} CCGGGGKRPPG (AmF) S (D-β-Nal) I {C}
33	{N} CCGGGGKRPPG (Hyp) G (Cpg) S (DTic) (Cpg) {C}
34	{N} CCGGGGKRPPG (Hyp) G (Cpg) S (DTic) (Cpg) {C}
35	{N} ac-CGGGGKRPPG (Hyp) G (Cpg) S (DTic) (Cpg) {C}
36	{N} KRPPG (Hyp) G (Cpg) S (DTic) (Cpg) {C}
37	{N} acyl-KRPPG (Hyp) G (Cpg) S (DTic) (Cpg) {C}
38	{N} CCRPPGFSPL {C}
39	{N} CCGGGG (Dorn) KRPPG (Hyp) G (Cpg) S (DTic) (Cpg) {C}
40	{N} CCGGGG (Dorn) KRPPG (Tha) G (Cpg) S (DTic) (Cpg) {C}
41	{N} CCGGGG (Dorn) RP (Hyp) G (Cpg) S (DTic) (Cpg) {C}

Tabla 4b: Péptido Y'

ID de SEC No	Secuencia de Péptido Y'
42	{N} CCGGGGKRPPGFSPL {C}

Ejemplo 6 Actividad de Inhibición de B1 In Vitro de los antagonistas del péptido PEG conjugado de los péptidos con actividad B1

Los péptidos y/o capaces de inhibir selectivamente la actividad de B1 en comparación con la actividad B2 fueron identificados usando ensayos tales como aquellos descritos en las secciones A, B, y C más adelante

A Ensayo in Vitro de la función de receptor B1 humano usando flujo de calcio

La activación del receptor B1 enlazado con G_q resulta en un incremento en el calcio intra celular La fotoproteína aequonn sensible al calcio puede, por lo tanto, ser usada como un indicador de la activación del receptor B1 Aquonn es

una fotoproteína de 21-KDa que forma un complejo bioluminiscente cuando es enlazada con la coelenterazina de cofactor cromóforo. Luego del enlace de calcio a este complejo, una reacción de oxidación de coelenterazina resulta en la producción de apoaequorina, coelenteramida, CO_2 y luz que puede ser detectada por luminometría convencional.

Un receptor de CHO D-/humano estable (número de acceso de GenBank AJ238044)/ línea celular de aequorina fue establecido y las células fueron mantenidas en suspensión en botellas giratorias que contenían una proporción 1:1 DMEM y HAM F12 (Gibco 11765-047), falta glucosa (Gibco 11965-084), suero dializado inactivado por calor 10% (Gibco 26300-061), aminoácidos no esenciales 1X (Gibco 11040-050), 1X de glutamina – pen strep (Gibco 10378-016), e higromicina, 300 μg / ml (Roche 843555) 15 a 24 horas antes del ensayo lumínico, 25 000 células /pozo (2.5E6 células/10ml/plato) fueron plaqueadas en placas de ensayo de fondo claro con lados negros de 96 pozos (Costar 3904).

El medio se remueve de los pozos y reemplazado con 60 μl de HAM libre de suero F12 y 30 mM de HEPES (pH 7.5) y 15 μM de coelenterazina (coelenterazina h Lucifenna número 90808, Diseño de ensayos (Ann Arbor, MI)). Las placas son entonces encubadas durante 1.5 a 2 horas. Placas de compuesto de diez puntos IC_{50} que contienen 1:3 o 1:5 de diluciones de compuesto antagonista y de una placa activadora de agonista (20 nM des-Arg10-Kallidin de concentración final, EC_{50}), son preparados usando Ham F12 con 30 nM HEPES, pH 7.5. Luego de la incubación de la coelenterazina, una plataforma de destello-luminómetro automatizada es usada para dispensar los compuestos antagonistas de B1 a la placa de células, una cámara CCD situada por debajo de la placa de células toma 12 imágenes de la placa de células a intervalos de 5 segundos para

determinar si hay cualquier actividad agonista con los compuestos. El agonista hB1, des-Arg₁₀-calidín, es entonces agregado a la placa de células y otras 12 imágenes son registradas para determinar el IC₅₀ del antagonista.

B Ensayo in Vitro de la función de receptor HB2 usando flujo de calcio

El flujo de calcio intracelular inducido por la activación del receptor HB2 es analizado usando una línea celular recombinante HB2 (CHO-K1) comprada de Perkinelmer (Wellesley, MA, catálogo No RBHB2C000EA) sobre un lector de placas de imágenes fluorométricas (FLIPR). Las células son cultivadas en frascos T225 que contienen la mezcla de nutriente F12 con HAM (Invitrogen Corp., Carlsband, CA, catálogo número 11765-047), 10% de suero bovino fetal clon II (Hyclone, Logan, UT, catálogo No SH3006603), 1 Mm de piruvato de sodio (100 Mm de material de partida, invitrogen corp Catálogo No 12454-013), y 0.4 mg/ml de gentamicina (G418, 50 mg/ml de gentamicina activa, invitrogen, catálogo No 10131-207). El medio de cultivo es cambiado día de por medio 24 horas antes al ensayo FLIPR, las células HB2/CHO se lavan una vez con PBS (invitrogen) y 10 ml de Versene (1:5000, invitrogen, catálogo No 15040-066) es agregado a cada frasco. Después de 5 minutos de incubación a 37 ° C, el versene es removido y las células son desatadas del frasco y re suspendidas en medio de cultivo. Las células son contadas y 25 000 células/pozo son plaqueadas en placas de ensayo de fondo claro hilados negros de 96 pozos (Costar, Acton, MA, catálogo No 3904). Las células son incubadas en un incubador de CO₂ A 37 ° C durante la noche.

El medio es aspirado de las células y reemplazado con 65 µl de amortiguador con carga de tinta. El amortiguador cargado es preparado por medio de diluir una solución de partida de 0.5 Mm de fluo-4AM (moléculas Probes,

Eugene, OR) disuelto en DMSO que contiene 10% (w/v) de ácido plurónico a una concentración de un μm en un medio Eagle modificado claro de Dulbecco (DMEM) que contiene 0.1% de BSA, 20 mM de HEPES, y 2.5 mM de probenecid (el probenecid inhibe la actividad de la proteína de transporte aniónico, y por lo tanto mejora la carga de tinta en las células) Las células son cargadas con tinta durante una hora a temperatura ambiente. El exceso de tinta es removido por medio de lavar las células dos veces con amortiguador de ensayo. El amortiguador de ensayo consiste de una solución de sal balanceada de Hank (HBSS) que contiene 20 mM de HEPES, 0.1% de BSA, y 2.5 mM de probenecid. Después de los ciclos de lavado, un volumen de 100 μl se deja en cada pozo, y la placa está lista para ser ensayada en el sistema FLIPR. Las placas de punto único del compuesto antagonistas POC (10 μm de concentración final) o las placas de compuesto IC_{50} de 10 puntos contienen 1:3 o 1:5 diluciones del compuesto antagonista y una placa activadora agonista (0.3 mM de concentración final de bradiquinina, EC_{80}) son preparadas usando amortiguador de ensayo. La placa de células y las placas de compuesto son cargadas en el FLIPR y durante el ensayo, las lecturas de fluorescencia son tomadas simultáneamente de todos los 96 pozos de la placa de células. 10 lecturas de un segundo son tomadas para establecer una línea de base estable para cada pozo, luego 25 μl de la placa antagonista de B1 es rápidamente agregada (50 $\mu\text{l}/\text{Sec}$). La señal de fluorescencia es medida en un segundo (1 minuto) seguido por intervalos de 6 segundos (2 minutos) durante un total de tres minutos para determinar si hay cualquier actividad agonista con el compuesto. El agonista B2, bradiquinina, es entonces agregado a la placa de células y otros tres minutos son registrados para determinar el porcentaje de inhibición en 10 μm (placas de POC) o el IC_{50} del antagonista.

Los valores IC_{50} para los péptidos conjugados por vehículo o por PEG ensayados en el ensayo de aequonina HB1 fueron en promedio reducidos ligeramente en la actividad in Vitro confenda a los péptidos conjugados hasta polímeros mayores de PEG. Por ejemplo, el péptido representado por la ID de SEC No 36 y su forma acetilada representada por la ID de SEC No 37, resultó en una IC_{50} de 30 Nm($\pm$ 5 Nm, n=8) Y 32 Nm($\pm$ 32 Nm, n=9) respectivamente en el receptor HB1. Sin embargo, el mismo péptido conjugado de B1 como se describió aquí demostró aproximadamente un incremento en IC_{50} . En las formas natvas, acetiladas y conjugadas por PEG del péptido fueron inactivadas a 10 μ m en el ensayo HB2 FLIPR. Ninguno de los compuestos mostró actividad agonista en cualquiera de los receptores HB1 o HB2.

C. Tejido con base en ensayos in Vitro de péptidos que ligan al receptor HB1

La actividad y selectividad antagonista para el receptor de bradiquinina B1 de los péptidos y/o péptidos conjugados por vehículo de la presente invención fueron determinados con el ensayo de contractilidad de vena umbilical humana in Vitro (HUV). Descripción más adelante.

Recipientes desnudos de endotelio fueron suspendidos en 20-ml de baños de órganos que contienen una solución de sal fisiológica estándar oxigenada (95% O_2 Y 5% de $C O_2$) y precalentada (37 ° C) de la siguiente composición (in Mm): NaCl 118.0, KCl 4.7, $MgSO_4$ 1.2, $CaCl_2$ 2.5, $KH_2 PO_4$ 1.2, $NaH CO_3$ 25.0 y glucosa 11.0 (ph 7.4). Soluciones altas en K^+ (80 Mm KCL) fueron preparadas por reemplazo equimolar de NaCl con KCL. Hoe 140 (1 μ m), mergetpa (1 μ m), y captopril (10 μ m), estuvieron también presentes en todos los experimentos para bloquear los receptores B2 e impedir la degradación del péptido, respectivamente.

Los tejidos fueron conectados a transistores de fuerza por registro de tensión isométrica y se les permitió entonces equilibrarse durante un tiempo suficiente bajo una tensión de descanso óptima. Los experimentos fueron llevados a cabo usando sistemas de órganos aislados semi automatizados que posee 8 baños de órganos cada uno, con adquisición de datos multicanal. Los tejidos fueron expuestos primero a una solución alta en K^+ (80 mM KCL) para obtener una contracción de control. Luego de lavados y un periodo subsecuente de equilibrio de 60 min, los tejidos fueron expuestos a concentraciones incrementales acumulativas de agonista de referencia Lys-desArg9 -BK para obtener curvas de concentración – respuesta en la ausencia (preparaciones de control) o presencia de diversas concentraciones de los compuestos de ensayo o del antagonista de referencia Lys- desArg9 (Leu8) –BK (preparaciones de ensayos), que fueron agregadas 15 minutos antes de la exposición al Lys desArg9 –BK. Una curva de concentración – respuesta al Lys- desArg9 -BK fue generada en cada preparación.

El parámetro medido fue el cambio máximo en la tensión inducida por cada concentración de agonista y en los resultados expresados como un porcentaje de las respuestas de control KCL. Los valores EC_{50} del agonista (concentración que produce una respuesta de la mitad del máximo) fueron calculados por análisis de regresión lineal de sus curvas de concentración – respuesta. Potencias de antagonistas de antagonistas de los compuestos de ensayo Lys-desArg9 (leu8)-BK fueron evaluadas en términos de valores pA_2 (-concentración logarítmica que produce un cambio hacia la derecha dos veces de la curva de concentración-respuesta del agonista), que fueron calculados de acuerdo con Van Rossum (Van Rossum, J M, cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters Arch Int Pharmacodyn Ther, 143 299-330 (1963)). Los valores PA_2 fueron

calculados usando solamente concentraciones de antagonistas que causaron un cambio hacia la derecha significativo de la curva de concentración – respuesta del agonista. Los valores PA₂ son dados como la media $\pm$ s.e.m. de tres determinaciones. La importancia estadística de las diferencias fueron determinadas usando el ensayo de t del estudiante y los valores p menor a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

D. Actividad de Inhibición de B1 In Vitro de Péptidos y/o Péptidos Conjugados

La efectividad de los péptidos y/o péptidos conjugados como inhibidores de la actividad de B1 (es decir "neutralización" de B1) también puede ser evaluada por medio de medir la habilidad de péptido y/o péptido conjugado para bloquear el CGRP estimulado por B1 y la liberación de la sustancia p y la señalización de calcio en cultivos neuronales de ganglio de raíz dorsal (DRG).

Cultivos Neuronales de Ganglio de Raíz Dorsal

Los ganglios de raíz dorsal son disectados uno por uno bajo condiciones asépticas de todos los segmentos espinales de ratas embrónicas de 19 días (E19) que son removidos quirúrgicamente del útero y de ratas Sprague-Dawley terminalmente anestesiadas y embarazadas (Charles River, Wilmington, MA). El DRG fue recolectado en un medio L-15 con hielo frío (GibcoBRL, Grand Island, NY) que contiene 5% de suero de caballo inactivado caliente (GibcoBRL), y cualquier tejido conectivo suelto y los vasos sanguíneos son removidos. El DRG es enjuagado dos veces en Ca^{2+} - y una salina amortiguada por fosfato de dulbeco libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (DPBS), pH 7.4 (GibcoBRL). El DRG es entonces disociado en una suspensión de célula única usando un sistema de disociación de

papaína (Worthington Biochemical Corp , Freehold NJ) Brevemente, los BRGS son incubados en una solución de digestión que contiene 20U/ml de papaína en una solución de sal balanceada de Earle (EBSS) A 37 ° C durante 50 minutos Las células son disociadas por trituración por medio de pipetas Pasteur pulidas al fuego en un medio de disociación que consiste de MEM/HamF12, 1 l, 1 mg/ml de inhibidor ovomucoide y un mg/ml de ovalbulina, y 0.005% de deoximbunocleasa 1 (DNASE) Las células disociadas son granuladas a 200 x g durante 5 minutos y resuspendidas en EBSS que contiene un mg/ml del inhibidor ovomucoide, un mg/ml de ovalbulina y 0.005% de DNasa La suspensión celular es centrifugada por medio de una solución gradiente que contiene 10 mg/ml de inhibidor ovomucoide, 10mg/ml de ovalbulina a 200 x g durante 6 minutos para remover los desechos de las células y luego se filtro por medio de una malla de nylon de 88 μ m (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) para remover cualesquier clumus El número de células es determinado con un hemocitómetro, y las células son sembradas en poly-oromitina 100 μ g /ml (Sigma St Louis MO) y laminina de ratón 1 μ g/ml (GibcoBRL)- placas de 96 pozos recubiertos en 10×10^3 células/pozo en un medio completo El medio completo consiste de medio mínimo esencial (MEM) y F12 de Ham, 1 l, penicilina (100U/ml), estreptomycin (100 μ g /ml), y 10% de suero de caballo inactivado por calor (GibcoBRL) Los cultivos son mantenidos a 37 ° C, 5% de CO₂ Y 100% de humedad Para controlar el crecimiento de células no neuronales, se incluyó 5-fluoruro-2 -deoxyundina (75 μ m) y undina (180 μ m) en el medio

Tratamiento con péptidos y/o péptidos conjugados de B1 y anti B1

Dos horas después del plaqueado las células son tratadas con β -B1 humano recombinante o β -B1 de rata recombinante a una concentración 10 ng/ml

(0.38NM) Los controles positivos comprenden anticuerpo anti-B1 diluido serialmente (R&D Systems, Minneapolis, MN) son aplicados a cada placa de cultivo. Los péptidos de ensayo o los péptidos conjugados de ensayo (por ejemplo, del ejemplo 1) son agregados a 10 concentraciones usando diluciones de señales de 3 a 16 veces. Todas las muestras son diluidas en medio completo antes de ser agregadas a los cultivos. El tiempo de incubación es generalmente de 40 horas antes de medir la expresión de VR1.

Medición de expresión de VR1 en neuronas DRG

Los cultivos son fijados con 4% de paraformaldehído en una solución de sal balanceada de Hank durante 15 minutos, bloqueados con superbloque (Pierce, Rockford, IL) y permeabilizados con 0.25% de nonidet p-40 (sigma) en tris HCL (Sigma)-salina amortiguada (TBS) durante una hora a temperatura ambiente. Los cultivos son enjuagados una vez con TDS que contiene 0.1% de Tween 20 (sigma) e incubados con IgG anti-VR1 de conejo (preparado en amgen) durante una y media horas a temperatura ambiente, seguido por incubación de un segundo anticuerpo anti conejo Eu-labeled marcado con Eu (Wallac Oy, Turku, Finland) durante una hora a temperatura ambiente. Los lavados con TBS (3x 5 minutos con agitación) se aplican después de cada incubación de anticuerpo.

La solución mejorada (150 µl/pozo, Wallac Oy) se agrega a los cultivos. La señal de fluorescencia se mide luego en un fluorómetro de tiempo resuelto (Wallac Oy). La expresión VR1 en las muestras tratadas con los vehículos de péptidos conjugados se determina al comparar con una curva estándar de titulación B1 de 0-1 000 ng/ml. El porcentaje de inhibición (comparado con la inhibición máxima

posible) del efecto B1 en la expresión VR1 en neuronas DRG se determina al comparar con los controles que no son B1 tratados

La unión del receptor detenorada y la actividad funcional para cada uno de los antagonistas B1 de péptido conjugado PEG se relaciona directamente con el tamaño del grupo PEG y vana de aproximado 5-200 veces de reducción en potencia. Los ligadores de poliglicina de aproximado 5-7 residuos trabajados bien para preservar la funcionalidad mientras que los ligadores muestran pequeña mejora ("ligador flexible") o probó ser un detrimento para actividad ("ligador rígido"). Finalmente, la tabal 8 ilustra la amplitud de esta solicitud con una vanedad de diferentes antagonistas de péptido conjugado PEG.

Tabla 8 Afinidad de unión (K_i) y potencia funcional (IC₅₀) en el receptor B1 humano (hb1) para el péptido y los antagonistas de péptido PEGilados

Reactivo PEG activo	Péptidos por PEG	Péptido (x ²) –(Y ²) 0 0 1	HB1 KI (Nm)	HB1 IC ₅₀ (NM)
MeO-20K-Maleimida ^a	1	ID de SEC No 28	114	110
MeO-20K-Maleimida ^a	1	ID de SEC No 29	252	237
MeO-20K-Maleimida ^a	1	ID de SEC No 30	230	61
MeO-20K-Maleimida ^a	1	ID de SEC No 29+42	22	54
MeO-20K-Maleimida ^a	1	ID de SEC No 32	9	69
MeO-20K-Maleimida ^a	1	ID de SEC No 33	75	98
MeO-20K-propionaldehído ^b	1	ID de SEC No 13	1	35
Maleimida-20K- Maleimida ^a	2	ID de SEC No 33	11	77
MeO-20K SPA ^c	1	ID de SEC No 13	10	52
Tetrakis-20K- SPA ^c	4	ID de SEC No 13	0 14	10
Tetrakis-20K- SPA ^d	4	ID de SEC No 13	0 14	10
ninguno	NA	ID de SEC No 13	0 10	0 5
ninguno	NA	ID de SEC No 15	0 19	1
ninguno	NA	ID de SEC No 49	0 77	0 5
ninguno	NA	ID de SEC No 50	0 2	6
ninguno	NA	ID de SEC No 22	0 38	2
ninguno	NA	ID de SEC No 37	0 8	1

a Generado por un proceso de un pot descrito en el esquema 4,

b Aminación reductiva en el residuo n-terminal, amina epsilon,

c Acilado en el residuo N-terminal, amina epsilon,

d Acilado en el residuo N-terminal amina alfa

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

A Ensayo de micro vellosidad de borde de cepillo de nylon de rata

Se preparan membranas de nylon de acuerdo con el procedimiento establecido por Booth et al (Biochemical Journal, 142 575 (1974)) Las concentraciones de proteínas se determinan por el método de Bradford (Anal Biochemistry , 72 248-254 (1976))

B Ensayo de homogenato S9 de pulmón humano o de rata

Pulmón humano o de rata se prepara como se describe por Skydgel et al (Biochemical Pharmacology 33 3471 (1984))

Los compuestos de ensayo se preparan en concentración de 1 Mm en una solución PBS (Ph=7.1) Los compuestos de ensayo se agregan a una preparación de tejido del procedimiento A o B (concentración de proteína final de 2 mg/ml) e incuban a 37° C En varios puntos de tiempo, la proteína se precipita con acetonitrilo, 0.1M HCL en acetonitrilo o 10% de TFA en agua El precipitado se remueve por centrifugación, y se filtra adicionalmente a través de una membrana de 0.1 µm la muestra se analiza luego por HPLC de fase reversa (4.6 x 300 MM Novapak HR C18 (Waters Corporation, Milford, MA) flujo = 1ml/min, gradiente lineal de 10% ACN (0.1% de ácido fórmico)- 90% agua (0.1% de ácido fórmico) a 50% ACN (0.1% de ácido fórmico)- 50% de agua (0.1% de ácido fórmico durante 20 minutos) con detección de espectroscopia de masa Las concentraciones de los compuestos de ensayo en el tiempo T relacionados con el estándar interno se ajustan a una función de pérdida de primer orden $[\text{compuesto}]_t = [\text{compuesto}]_0 (1 - e^{-kT})$, "[compuesto]₀" Y "[compuesto]_t" son la Concentración del compuesto

en ensayo en el tiempo 0 y la concentración del compuesto de ensayo en el tiempo que la muestra se retira respectivamente, la variable "t" es el tiempo en que la muestra se retira para análisis, y k es la proporción de índice de concentración de compuesto de ensayo) La variable "k" se determina al utilizar una aproximación de regresión no lineal suministrada por el paquete de software estadístico JMP Dado que la concentración de compuesto de ensayo se reduce con el tiempo, los valores de "k" son negativos La vida media se calcula a partir del valor derivado del modelo de "k" que utiliza la siguiente fórmula $T_{1/2} = (\ln 2)/k$

Ejemplo 8 Actividad anticonceptiva In vivo de péptidos anti-B1 y péptidos anti-B1 de vehículo conjugado en modelos de dolor en rata y mono

A Modelo de dolor neuropático en ratas Ratas sprague-Dawley (200G) se anestesian con anestesia isoflurano inhalada y los nervios de la espina lumbar izquierdo en el nivel de L5 y L6 se ligan en forma apretada (sutura de 4-0) distante del ganglio de la raíz dorsal y antes de la entrada en el nervio ciático, como se describió primero por Kim y Cheng (An experimental model formulation peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain 50 355-363, (1992)) Las incisiones se cierran y se les permite recuperarse a las ratas Este procedimiento resulta en alodinia mecánica (TÁCTIL) en la pata trasera izquierda según se evaluó al registrar la presión en la pata afectada (ipsilateral al lado del nervio lesionado) se retira el estímulo calificado (los filamentos Von Frey F varían 40 a 1481 Mn) aplicado perpendicularmente a la superficie plana de la pata (entre las almohadillas) a través de jaulas de observación de malla de alambre Un umbral de retro de pata (PWT) se determina al incrementar secuencialmente y reducir la fuerza del estímulo y analizar los datos de retro utilizando un ensayo no paramétrico Dixon, según se describe en Chaplan, S R ,

et al (Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw J Neurosci Meth, 53 55-63 (1994))

Ratas normales y ratas de cirugía "sham" (nervios aislados pero coligados) resisten al menos 148.1 mN (equivalente 15 g) de presión sin respuesta. Los nervios espinales ligados de las ratas responden tan poco como 4.0 mN (equivalente a 0.41 g) de presión en la pata afectada. Las ratas se incluyen en el estudio solo si ellas no exhiben su función motora (por ejemplo, arrastrar una pata) y su PWT está por debajo de 39.2 s (equivalente a 4.0 g). Al menos siete días después de la cirugía de las ratas se trataron con péptidos de ensayo o péptidos de vehículo conjugado de ensayo (usualmente una dosis seleccionada de cerca de 1 mg/kg y cerca de 60 mg/kg, respectivamente) o diluyente de control (PBS) una vez mediante inyección s.c. y el PWT se determina cada día de hoy en adelante durante 7 días.

B Modelo de dolor inflamatorio CFA en Rata Ratas Sprague-Dawley (200 g) se anestesiaron ligeramente con anestesia inhalada de isoflurano y la pata trasera izquierda se le inyectó con adyuvante de Freund completo (CFA), 0.15 ml. Este procedimiento resulta en alodinia mecánica (táctil) en la pata izquierda trasera según se evaluó al registrar la presión en la que la pata trasera se retrae del estímulo calificado (los filamentos von Frey varían de 4.0 a 148.1 mN) aplicado perpendicularmente a la superficie plantar de la pata (entre las almohadillas) a través de observación en jaulas de malla de alambre. El PWT se determina al incrementar en forma secuencial y reducir la fuerza del estímulo y analizar los datos de retirada utilizando un ensayo no paramétrico Dixon, según se describe en Chaplan et al (1994). Las ratas se incluyen en el estudio solo si ellas no exhiben disfunción motora (por ejemplo, arrastrar una pata) o piel rota y su PWT esté por

debajo de 39.2 mN (equivalente a 4.0 g). Al menos después de siete días las ratas con inyección de CFA se trataron con péptidos de ensayo y/o péptidos conjugados de vehículo de ensayo (usualmente una dosis seleccionada de 60 mg/kg) o solución de control (PBS) una vez por inyección s.c. y el PWT determina cada día de hoy en adelante durante 7 días. El promedio de umbral de retiro de pata (PWT) se convierte a porcentaje de efecto máximo posible (% MPE) utilizando la siguiente fórmula: $\%MPE = 100 \times (\text{PWT de ratas tratadas} - \text{PWT de ratas control}) / (15 - \text{PWT de ratas de control})$. Así, el valor de corte de 15 g (148.1 mN) es equivalente a 100% del MPE y la respuesta de control es equivalente a 0% MPE.

Péptidos prefendos y péptidos conjugado de vehículos de la presente invención se espera que produzcan un efecto antinociceptivo con una relación PD en una dosis seleccionada de cerca de 1 mg/kg y cerca de 60 mg/kg, respectivamente.

B Modelo de Inflamación LPS en Mono Verde La efectividad de los péptidos y/o péptidos conjugados como inhibidores de actividad B1 se pueden evaluar en monos verdes macho (*Cercopithecus aethiops* St Kitts) retados localmente con agonistas B1 esencialmente como se describe en deBlois y Horlick (British Journal of Pharmacology 132: 327-335 (2002)), que se incorpora por medio de la presente como referencia en su totalidad).

Con el fin de determinar si los antagonistas de péptido conjugado PEG de la presente invención inhiben B1 inducido por oedema, los estudios descritos adelante se conducen en monos verdes machos (*Cercopithecus aethiops* St Kitts) en la granja experimental Caribbean Primates Ltd (St Kitts, West Indies). Se revisaron los procedimientos y se aceptaron por el Animal Care Committees.

del CR-CHUM (Montreal, Canada) y del Caribbean Primates Ltd (St Kitts, West Indies) Los animales que pesaban 6.0 ± 0.5 kg (n=67) se anestesiaron (50 mg de quetamina kg^{-1}) y se pretrataron con una inyección intravenosa sencilla de LPS ($90 \mu\text{g kg}^{-1}$) o solución salina (1 ml) por vía de vena safena

1 Estudios de inflamación

Oedema inducido por quinina se evalúa por ensayo de pliegue de piel ventral (Sciberras et al, 1987) En resumen, los monos anestesiados se inyectaron con captopril (1 mg kg^{-1} 30 min antes de ensayo) Una inyección subcutánea sencilla de dKD,BK o el vehículo (2 mM de amastatina en 100 μl de lactato de Ringer) se aplica en el área ventral y el incremento en el espesor de los pliegues de la piel se monitorea durante 30-45 min utilizando un caliper calibrado Los resultados se expresaron como la diferencia entre el espesor del pliegue antes y después de la inyección subcutánea El captopril y la amastatina se utilizaron para reducir la degradación de quininas en el terminal amino y carboxilo, respectivamente

ANÁLISIS DE ANTAGONISTA SCHILD

La relación de respuesta de dosis para dKD (1-100 nmol)- indujeron oedema se que se determina en 24 h post-LPS en la ausencia o presencia de concentraciones diferentes de antagonista de péptido PEG BK (30 nmol) se utiliza como un control positivo

CURSO DE TIEMPO DE ANTAGONISTA

El curso de tiempo de inhibición por antagonista se determina en 4, 24, 48, 72 y/o 96 h después de administración de bolo sencillo. El BK (30 nmol) se utiliza como un control positivo.

DROGAS

El clorhidrato de cetamina, LPS, amastatina y captopril son de Sigma (MO, U S A). Todos los péptidos son de Phoenix Pharmaceuticals (CA, U S A).

ESTADÍSTICAS

Los valores se presentan como error estándar $\pm$ medio de la media (s e media). En estudios de edema, el espesor pre-inyección del pliegue de la piel se sustrajo de los valores después del reto subcutáneo. Los cálculos de ajuste de curva y EC_{50} se obtienen utilizando el software Delta Graph 4.0 de Apple Computers. Los datos se comparan por análisis de dos vías de varianza seguido por ensayo de t de Student de una cola con corrección Bonferroni. $P < 0.05$ se considera significativo estadísticamente.

La administración LPS a monos verdes incrementado desde un nivel nulo su sensibilidad a un agonista de receptor B_1 en un ensayo de formación de edema. Comparativamente, las respuestas a los agonistas de receptor B_2 BK no se afectaron.

Sorprendentemente, una dosis sencilla subcutánea en 10 mg/kg de un péptido conjugado PEG 5kD representativo y un péptido conjugado PEG 20 kD del mismo péptido análogo fue suficiente para relacionar un agonista B1 preestablecido que induce respuesta inflamatoria y suprime sucesivamente dianamente retos agonistas durante 3 y 4 días, respectivamente. No se observa taquifalaxis con el reto B1 hasta 96 h. El efecto también se determina al ser selectivo en B1 a diferencia de B2. Adicionalmente, el conjugado PEG 5K inhibe el edema en respuesta al reto dKD mayor que el péptido no conjugado (es decir, péptido nativo) aunque el ataque rápido y la eficacia fue comparable para ambas moléculas hasta 1 25 horas.

Ejemplo 9 Estudios Farmacocinéticos en Ratas

Varios péptidos o péptidos conjugados (en un medio acuoso) se dosificaron como un bolo para ratas Sprague- Dawley machos por vía de ruta intravenosa (iv) o subcutánea (sc). Se recolectaron muestras de sangre en varios puntos de tiempo (por ejemplo, 0, 15, 30 minutos y/o 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 240, y/o 320 horas después de la inyección) en tubos hepanzados. El plasma se remueve de las células peletizadas luego de centrifugación y congelamiento procesadas inmediatamente. El compuesto de interés en el plasma se cuantifica mediante método de análisis específico LC-MS/MS o un método ELISA. Varios parámetros farmacocinéticos estándar tales como aclaramiento (CL), aclaramiento aparente (CL/F), volumen de distribución (Vss), tiempo medio de residencia (MRT), área bajo la curva (AUC), y vida media terminal ($t_{1/2}$) se calcularon por un método no compartamental (por ejemplo ver Tabla 9).

Tabla 9 Estudios Farmacocinéticos de antagonistas B1 de péptido y péptido PEGilado B1

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

a Generado por un proceso de un "pot" descrito en el Esquema 4,
b Aminación reductiva en el residuo n-terminal, amina epsilon,
c 1 mpk sc,
d Acilado en el residuo N-terminal, amina epsilon,
e 5 mpk sc
f Acilado en el residuo N-terminal amina alfa
g 30 mpk sc, h 1 mpk iv, e i 3 mpk iv

Se apreciará que varias modificaciones se pueden hacer en la invención como se describió anteriormente. De acuerdo con esto, el alcance de la invención se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es

- 1 Una composición de materia de la fórmula $F-[(X^1) - (Y^1)_n]$, o una sal fisiológicamente aceptable de esta en donde

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

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

L^1 y L^2 son independientemente en cada caso ausentes o ligadores que tienen de 0 a 9 residuos de aminoácido,

N es 0 a 3, y

P^1 y si están presentes P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido o del receptor de bradiquinina B1

- 2 Una composición de materia de la fórmula $F'-R_z$, o una sal fisiológicamente aceptable de esta, en donde

F' es un vehículo multivalente,

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

en donde R está covalentemente unido a F',

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

L^1 y L^2 son independientemente en cada caso ausentes o ligadores que tienen de 0 a 9 residuos de aminoácido,

n es 0 a 3,

z es 2 a 8, y

P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor de bradiquinina B1

- 3 La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor B1 de bradiquinina seleccionado del grupo de péptidos que consiste de los péptidos mostrados en la ID de SEC No 5-26, 43-60, y derivados de estos
- 4 La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde X^1 es un péptido que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de péptidos mostrados en las ID de SEC No 27-41 y derivados de estas
- 5 La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde n es 1 y P^2 es un péptido que tiene una secuencia como se muestra en la ID de SEC No 42
- 6 La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde n es 0
- 7 La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido de los grupos de péptidos que consisten de péptidos definidos por la fórmula



en donde

a^0 es un aminoácido aromático, alifático, heterocíclico, o alicíclico, básico o neutro, dipéptido básico, o están ausentes,

a^1 , a^2 , a^3 , y a^4 son independientemente en cada caso aminoácidos aromáticos, alifáticos, heterocíclicos, o alicíclicos, básicos o neutros,

a^6 es Ser

a^5 , a^7 y a^8 son independientemente en cada caso aminoácidos aromáticos, alifáticos, heterocíclicos, o alicíclicos, siempre y cuyo al menos uno de a^5 , a^7 y a^8 se seleccionen de Chg, Cpg, Igl, Iglb, Nig y Nigb de la configuración D-o L- y

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

8 La composición de materia de la reivindicación 7 en donde

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

a^1 es un aminoácido básico o di-péptido básico,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 y a^8 son independientemente en cada caso un aminoácido indanilo,

a^6 es Ser,

a^7 es un aminoácido D-indanilo,

a^9 es Cpg, y

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

9 La composición de materia de la reivindicación 7 en donde

a^0 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, DLys, o un di-péptido que consiste de dos aminoácidos independientemente seleccionados del grupo que consiste de Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, o DLys

a^1 es Arg,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 es Cpg

a^6 es Ser,

a^7 es DTic, y

a^8 es Cpg

10 La composición de materia de la reivindicación 7 en donde

a^0 es Lys,-Lys

a^1 es Arg,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 es IgIb,

a^6 es Ser,

a^7 es DIgIb, y

a^8 es Oic

11 La composición de materia de la reivindicación 7 en donde

a^0 es DArg,

a^1 es Arg,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 es Igl,

a^6 es Ser,

a^7 es DlgI, y

a^8 es Oic

12 La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del grupo de péptidos que consisten de péptidos definidos por la fórmula



en donde

a^0 es un aminoácido básico o ausente o un di-péptido básico,

a^1 es Arg,

a^2 es Pro,

a^3 es Pro,

a^4 es Gly,

a^5 es Me-Phe

a^6 es Ser,

a^7 es D- β -Nal, y

a⁸ es lle

- 13 La composición de matena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde dicho L¹ es un ligador de peptidilo que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de ID de SEC No 100 a ID de SEC No 105, inclusive
 - 14 La composición de matena la reivindicación 3 en donde dicho L¹ es un ligador de peptidilo que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de ID de SEC No 100 a ID de SEC No 105, inclusive
 - 15 Un método de tratamiento, prevención o mejoramiento de una enfermedad o condición asociada con o mediada por actividad B1 que comprende administrar a un sujeto humano o animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de matena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2
 - 16 Un método para tratar, prevenir, o mejorar una enfermedad o condición asociada con o mediada por actividad B1 que comprende administrar a un sujeto humano o animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de matena de acuerdo con la reivindicación 3
 - 17 El método de acuerdo con la reivindicación 15 en donde la enfermedad o condición se selecciona del grupo que consiste de inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la
-

espalda inferior, dolor de trauma, dolor quirúrgico, desórdenes inflamatorios del intestino, asma, y rinitis alérgica

- 18 El método de acuerdo con la reivindicación 16 en donde la enfermedad o condición se selecciona del grupo que consiste de inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la espalda inferior, dolor de trauma, dolor quirúrgico, desórdenes inflamatorios del intestino, asma, y rinitis alérgica
- 19 Una composición farmacéutica que comprende una composición de materia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y al menos un diluyente farmacéuticamente aceptable, excipiente, o portador
- 20 Una composición de materia de la fórmula

$F-[(X^1) - (Y^1)]_n$, o una sal fisiológicamente aceptable de esta en donde

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

F es un PEG covalentemente unido X^1 o Y^1 ,

L^1 y L^2 son independientemente en cada caso ausentes o ligadores que tienen de 0 a 9 residuos de aminoácido,

N es 0 a 3, y

P^1 y, si están presentes, P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido o del receptor de bradiquinina B1

- 21 La composición de materia de la reivindicación 2 en donde F' es PEG multivalente
- 22 La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 20-21 en donde P¹ y P² son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor B1 de bradiquinina seleccionado del grupo de péptidos que consiste de los péptidos mostrados en las ID de SEC No 5-60, y derivados de estos
- 23 La composición de materia de la reivindicación 21 en donde X¹ es un péptido que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de los péptidos como se muestra en las ID de SEC No 27-41 y derivados de estas
- 24 La composición de materia de la reivindicación 21 en donde n es 0 y z es 2-8
- 25 La composición de materia de la reivindicación 24 en donde z es 4
- 26 Una composición de materia de la fórmula

$F-[(X^1)-(Y^1)]_n$ o sal fisiológicamente aceptable de esta, en donde

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

F es un vehículo covalentemente unido a X¹ o Y¹,

L^1 y L^2 son independientemente en cada caso ausentes o ligadores que tiene de 0 a 9 residuos de aminoácido,

n es 0 a 3, y

P^1 y, si está presente, P^2 son independientemente en cada caso antagonistas del grupo de péptidos que consiste de péptidos definidos por la fórmula



en donde

a^0 es un aminoácido aromático, alifático, heterocíclico, o alicíclico, básico o neutro, dipéptido, o están ausentes,

a^1 , a^2 , a^3 , y a^4 son independientemente en cada caso aminoácidos aromáticos, alifáticos, heterocíclicos, o alicíclicos, básicos o neutros,

a^6 es Ser

a^5 , a^7 y a^8 son aminoácidos aromáticos, independientemente en cada caso alifáticos, heterocíclicos, o alicíclicos, siempre y cuyo al menos uno de a^5 , a^7 y a^8 se seleccionen de Chg, Cpg, Igl α , Igl β , Niga y Nig β de la configuración D-o L-, y

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

27 Una composición de matena de la fórmula

$F'\text{-R}_z$, o una sal fisiológicamente aceptable de esta, en donde

F' es un vehículo multivalente,

R es independientemente en cada caso $-(X^1)\text{-(Y}^1)_n$

en donde R está covalentemente unido a F' .

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

L^1 y L^2 son independientemente en cada caso ausentes o ligadores que
 tienen de 0 a 9 residuos de aminoácido,

n es 0 a 3,

z es 2 a 8, y

P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas del grupo
 de péptidos que consiste de péptidos definidos por la fórmula



en donde

a^0 es un aminoácido aromático, alifático, heterocíclico, o alicíclico,
 básico o neutro, dipéptido, o están ausentes,

a^1 , a^2 , a^3 , y a^4 son independientemente en cada caso aminoácidos
 aromáticos, alifáticos, heterocíclicos, o alicíclicos, básicos o neutros,

a^6 es Ser

a^5 , a^7 y a^8 son aminoácidos aromáticos, independientemente en cada
 caso alifáticos, heterocíclicos, o alicíclicos, siempre y cuyo al menos uno
 de a^5 , a^7 y a^8 se seleccionen de Chg, Cpg, Igl_a, Igl_b, Nig_a y Nig_b de la
 configuración D-o L-, y

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

28 La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 26-
 27 en donde

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

a^1 es un aminoácido básico,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 y a^8 son independientemente en cada caso un aminoácido indanilo,

a^6 es Ser,

a^7 es un aminoácido D-indanilo,

a^8 es Cpg, y

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

29 La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 26-27 en donde

a^0 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, DLys, o un di-péptido que consiste de dos aminoácidos independientemente seleccionados del grupo que consiste de Arg, D-Arg, Orn, D-Orn, Lys, o DLys

a^1 es Arg,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 es Cpg

a^6 es Ser,

a^7 es DTic, y

a^8 es Cpg

30 La composición de matena de una cualquiera de las reivindicaciones 26-27 en donde

a^0 es D-Arg, o di-péptido seleccionado del grupo que consiste de , Lys-Lys, DLys-Lys y DOrn-Lys

a^1 es Arg,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 es Iglb,

a^6 es Ser,

a^7 es DIglb, y

a^8 es Oic

31 La composición de matena de una cualquiera de las reivindicaciones 26-27 en donde

a^0 es DArg o un di-péptido Lys-Lys,

a^1 es Arg,

a^2 es Pro,

a^3 es Hyp,

a^4 es Gly,

a^5 es Igl,

a^6 es Ser,

a^7 es DIgl, y

a^8 es Oic

- 32 Una composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde P^1 y P^2 son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del grupo de péptidos que consiste de péptidos definidos por la fórmula



en donde

a^0 es D-Arg, o un di-péptido seleccionado del grupo que consiste de Lys-Lys, DLys-Lys, y DOrn-Lys,

a^1 es Arg,

a^2 es Pro,

a^3 es Pro,

a^4 es Gly,

a^5 es Me-Phe

a^6 es Ser,

a^7 es D- β -Nal, y

a^8 es Cpg

- 33 La composición de materia de la reivindicación 32 en donde dicho L^1 es un péptido ligador que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de ID de SEC No 100 a ID de SEC No 105, inclusive

- 34 La composición de materia de la reivindicación 33 en dicho polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado del grupo que consiste de

- I 5,000 Daltons,
- II 20,000 Daltons,
- III 24,000 Daltons,
- IV 30,000 Daltons,
- V 40,000 Daltons, y
- VI 60,000 Daltons,

35 La composición de la matena de la reivindicación 34 en donde dicha composición de matena es capaz de actividad de receptor B1 antagonizante in Vitro y tiene una vida media terapéuticamente aceptable in vivo en mamíferos

36 Un método para tratar, prevenir, o mejorar una enfermedad o condición asociada con o mediada por actividad B1 que comprende administrar a un sujeto humano o animal una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de matena de acuerdo con la reivindicación 34

37 El método de acuerdo con la reivindicación 35 en donde la enfermedad o condición se selecciona del grupo que consiste de inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la espalda inferior, dolor de trauma, dolor quirúrgico, desórdenes inflamatorios del intestino, asma, y rinitis alérgica

38 Una composición farmacéutica que comprende la composición de matena de acuerdo con la reivindicación 34 y al menos un diluyente farmacéuticamente aceptable, excipiente, o portador

- 39 El uso de la composición de materia de acuerdo con la reivindicación 34 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición seleccionada del grupo que consiste de inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la espalda inferior, dolor de trauma, dolor quirúrgico, desórdenes inflamatorios del intestino, asma, y rinitis alérgica
- 40 Un antagonista de péptido del receptor B1 de bradiquinina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de ID de SEC No 15-35, 39-54, derivados de estos, y sales fisiológicamente aceptables de estos
- 41 Un antagonista de péptido del receptor B1 de bradiquinina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de ID de SEC No 15-35, o una sal fisiológicamente aceptable de esta
- 42 El péptido de la reivindicación 41 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de ID de SEC No 15-26
- 43 El péptido de la reivindicación 40 en donde el aminoácido N-terminal es un aminoácido D
- 44 El péptido de la reivindicación 43 en donde el aminoácido N-terminal se selecciona del grupo que consiste de D-Dab, DLys, DArg, y DOrn
-

- 45 Una composición farmacéutica que comprende un antagonista de péptido de receptor B1 de bradiquinina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la ID de SEC No 15-35 y al menos un diluyente farmacéuticamente aceptable, excipiente, o portador
- 46 Un método para tratar, evitar, o mejorar una enfermedad o condición asociada con o mediada por actividad B1 que comprende administrar a un sujeto humano o animal una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un péptido antagonista del receptor B1 de bradiquinina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de ID de SEC No 15-35 y al menos un diluyente farmacéuticamente aceptable, excipiente, o portador
- 47 El método de acuerdo con la reivindicación 46 en donde la enfermedad o condición se selecciona del grupo que consiste de inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor bajo de la espalda, dolor de trauma, dolor quirúrgico, desórdenes inflamatorios del intestino, asma, y rinitis alérgica
- 48 El uso de una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 19 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición seleccionada del grupo que consiste de inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la espalda inferior, dolor de trauma, dolor quirúrgico, desórdenes inflamatorios del intestino, asma, y rinitis alérgica
-

- 49 El uso de una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 45 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición seleccionada del grupo que consiste de inflamación, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor dental, dolor de espalda, dolor de la espalda inferior, dolor de trauma, dolor quirúrgico, desórdenes inflamatorios del intestino, asma, y rinitis alérgica

RESUMEN

La presente invención se relaciona con ciertos péptidos biológicamente activos y péptidos conjugados que se pueden utilizar como terapéuticos o profilácticos contra enfermedades o condiciones ligadas a B1 como los agentes causantes. En una modalidad preferida de la invención los péptidos conjugados PEG biológicamente activos se suministran. En un aspecto de la presente invención, los péptidos conjugados PEG farmacológicamente activos de la presente invención son útiles para tratar la inflamación o dolor.

A-836B PCT SEQ ST25 txt
SEQUENCE LISTING

<110> Amgen Inc
<120> ANTAGONISTS OF THE BRADYKININ B1 RECEPTOR
<130> A-836B
<140> Not Yet Rec'd
<141> 2004-10-22
<150> 60/538,929
<151> 2004-01-24
<150> Not Yet Received
<151> 2004-10-21
<150> 60/513,913
<151> 2003-10-22
<160> 60
<170> PatentIn version 3 2
<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Human
<400> 1

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> HUMAN
<400> 2

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 3

Met Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 4

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

A-836B PCT SEQ ST25 txt

1

5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 5

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 6

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Thr

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as DTrp

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Oic

<400> 7

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg

295

296

A-836B PCT SEQ ST25 txt
10

1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Thi

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as DTic

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Oic

<400> 8

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Thi

<220>

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<221> misc_feature
 <222> (8) (8)
 <223> Xaa at position 8 is defined as DHpe

297

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) (9)
 <223> Xaa at position 9 is defined as Oic

<400> 9

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) (1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) (7)
 <223> Xaa at position 7 is defined as MePhe

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) (9)
 <223> Xaa at position 9 is defined as D-Beta-NaI

<400> 10

Leu Leu Arg Pro Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4) (4)
 <223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) (6)
 <223> Xaa at position 6 is defined as Igl

A-836B PCT SEQ ST25 txt

298

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Dlg1

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Oic

<400> 11

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Igl

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dlg1

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Oic

<400> 12

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

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature

298

A-836B PCT SEQ ST25 txt

299

<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 13

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

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DArg

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Igl

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Df5f

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Igl

<400> 14

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa Arg
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<223> ARTIFICIAL

291
300

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Dorn

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 15

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Dorn

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Thz

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 16

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

A-836B PCT SEQ ST25 txt
10

1

5

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

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as 3Pa1

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 17

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as 4Pa1

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 18

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Cha

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Cpg

<400> 19

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as 2Na1

A-836B PCT SEQ ST25 txt

303

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Cpg

<400> 20

Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Cpg

<400> 21

Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>

303

304

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (1)

<223> Xaa at position 1 is defined as Dlys

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) (5)

<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 22

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) (2)

<223> Xaa at position 2 is defined as Dorn

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) (5)

<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

304
305

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<400> 23

Leu Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE<220>
<221> misc_feature
<222> (2) (2)
<223> Xaa at position 2 is defined as Cha<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 24

Leu Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE<220>
<221> misc_feature
<222> (2) (2)
<223> Xaa at position 2 is defined as Abu<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)

305

306

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtlc

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 25

Leu Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) (2)

<223> Xaa at position 1 is defined as 2NaI

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) (3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) (5)

<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (6) (6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (8) (8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtlc

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<220>

306

307

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<221> misc_feature

<222> (11) (11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

Leu Xaa Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 27

Cys Gly Gly Gly Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<223> ARTIFICIAL

<400> 28

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<223> ARTIFICIAL

<400> 29

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10 15

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 30

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

Leu

307
308

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2

<400> 31

Cys Gly Xaa Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa at position 13 is defined as MePhe

<220>
<221> misc_feature
<222> (15) (15)
<223> Xaa at position 15 is defined as D-Beta-NaI

<400> 32
Cys Gly Gly Gly Gly Gly Leu Leu Arg Pro Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5 10 15

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (11) (11)
<223> Xaa at position 11 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa at position 13 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature

308

309

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<222> (15) (15)
<223> Xaa at position 15 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (16) (16)
<223> Xaa at position 16 is defined as Cpg

<400> 33

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

<210> 34
<211> 18
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (12) (12)
<223> Xaa at position 12 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (14) (14)
<223> Xaa at position 14 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (15) (15)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (16) (16)
<223> Xaa at position 16 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (17) (17)
<223> Xaa at position 17 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (18) (18)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 34

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

Xaa Xaa

307

310

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<210> 35
<211> 16
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (11) (11)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (12) (12)
<223> Xaa at position 12 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (14) (14)
<223> Xaa at position 14 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (15) (15)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (16) (16)
<223> Xaa at position 16 is defined as Dtlc

<220>
<221> misc_feature
<222> (17) (17)
<223> Xaa at position 17 is defined as Cpg

<400> 35

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

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

A-836B PCT SEQ ST25 txt

311

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 36
Lys Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature

~~31~~
312

A-8368 PCT SEQ ST25 txt

<222> (11) (11)

<223> Xaa at position 11 is defined as Cpg

<400> 37

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

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 38

Cys Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as DOrn

<220>

<221> misc_feature

<222> (11) (11)

<223> Xaa at position 11 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (13) (13)

<223> Xaa at position 13 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (15) (15)

<223> Xaa at position 15 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (16) (16)

<223> Xaa at position 16 is defined as Cpg

<400> 39

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

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

312

A-836B PCT SEQ ST25 txt

313

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as DOrn

<220>
<221> misc_feature
<222> (11) (11)
<223> Xaa at position 11 is defined as Thz

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa at position 13 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (15) (15)
<223> Xaa at position 15 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (16) (16)
<223> Xaa at position 16 is defined as Cpg

<400> 40

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

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as DOrn

<220>
<221> misc_feature
<222> (11) (11)
<223> Xaa at position 11 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (13) (13)
<223> Xaa at position 14 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (15) (15)
<223> Xaa at position 15 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (16) (16)
<223> Xaa at position 16 is defined as Cpg

A-836B PCT SEQ ST25 txt

314

<400> 41

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

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<400> 42

Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Leu
1 5 10 15

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (1)

<223> Xaa at position 1 is defined as D-Dab

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) (5)

<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

<221> misc_feature

<222> (10) (10)

<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 43

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

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

34

315

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as D-Dab

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 44

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Dorn

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>

315

316

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 45

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as DOrn

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 46

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as D-3'Pa1

316

A-836B PCT SEQ ST25 txt

317

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 47

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as D-3'Pa1

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 48

317

318

A-836B PCT SEQ ST25 txt

Xaa Leu Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as D-Lys

<220>
<221> misc_feature
<222> (2) (2)
<223> Xaa at position 2 is defined as D-2-Nal

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtlc

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 49

Xaa Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (2) (2)
<223> Xaa at position 2 is defined as D-2-Nal

<220>
<221> misc_feature
<222> (5) (5)
<223> Xaa at position 5 is defined as Hyp

318

A-836B PCT SEQ ST25 txt

319

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Cpg

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as Dtic

<220>
<221> misc_feature
<222> (10) (10)
<223> Xaa at position 10 is defined as Cpg

<400> 50

Leu Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Dorn

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-NaI

<400> 51

Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)

3A

A-836B PCT SEQ ST25 txt

320

<223> ACETYLATION

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (1)

<223> Xaa at position 1 is defined as DOrn

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) (3)

<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>

<221> misc_feature

<222> (6) (6)

<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>

<221> misc_feature

<222> (8) (8)

<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-NaI

<400> 52

Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

1

5

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (1)

<223> Xaa at position 1 is defined as DOrn

<220>

<221> misc_feature

<222> (4) (4)

<223> Xaa at position 4 is defined as Oic

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) (7)

<223> Xaa at position 7 is defined as Me-Phe

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) (9)

<223> Xaa at position 9 is defined as D-Beta-NaI

<400> 53

Xaa Leu Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

1

5

10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

A-836B PCT SEQ ST25 txt

321

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Dorn

<220>
<221> misc_feature
<222> (4) (4)
<223> Xaa at position 4 is defined as Oic

<220>
<221> misc_feature
<222> (7) (7)
<223> Xaa at position 7 is defined as Me-Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (9) (9)
<223> Xaa at position 9 is defined as D-Beta-NaI

<400> 54

Xaa Leu Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5 10

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as Me-Phe

<400> 55

Leu Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

A-836B PCT SEQ ST25 txt

322

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-Nal
<400> 56

Leu Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Orn

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-Nal

<400> 57

Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (1)
<223> Xaa at position 1 is defined as Orn

<220>
<221> misc_feature

A-836B PCT SEQ ST25 txt

323

<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-NaI

<400> 58

Xaa Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-NaI

<400> 59

Leu Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARTIFICIAL PEPTIDE

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> misc_feature
<222> (3) (3)
<223> Xaa at position 3 is defined as Oic

323

A-836B PCT SEQ ST25 txt

<220>
<221> misc_feature
<222> (6) (6)
<223> Xaa at position 6 is defined as Me-Phe

324

<220>
<221> misc_feature
<222> (8) (8)
<223> Xaa at position 8 is defined as D-Beta-NaI

<400> 60

Leu Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile
1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2004/034976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K47/48 C07K7/18 A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STEWART JOHN M ET AL "Metabolism-resistant bradykinin antagonists: Development and applications" BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol 382, no 1, January 2001 (2001-01), pages 37-41, XP009042832 ISSN 1431-6730 cited in the application Abstract, Table 1, B-9958	1-49
X	US 5 834 431 A (GERA LAJOS ET AL) 10 November 1998 (1998-11-10) cited in the application Abstract, claim 5, 5th sequence -/-	1-49



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents

- A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- E* earlier document but published on or after the international filing date
- L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 January 2005

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P. B. 5010 Patentstr. 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,
Fac. (+31-70) 340-2018

Authorized officer

Lopez Garcia, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/034976

326

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAYMOND P ET AL "Quantification of des-Arg<9>-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay application to its kinetic profile during plasma activation" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B V ,AMSTERDAM, NL, vol 180, no 2, 27 March 1995 (1995-03-27), pages 247-257, XP004021047 ISSN 0022-1759 Abstract, p 249, col 1, paragraph 2	1-49
X	US 5 849 863 A (CHAN DANIEL C ET AL) 15 December 1998 (1998-12-15) cited in the application Abstract, col 3, l 10-col 7, l 31	1-49
A	DE 24 35 642 A (HOFFMANN LA ROCHE) 5 February 1976 (1976-02-05) Abstract, p 16, 2nd paragraph	1-49
A	US 6 407 207 B1 (BORKOWSKI JOSEPH A ET AL) 18 June 2002 (2002-06-18) Abstract, col 3, l 10-11	1-49
A	NEUGEBAUER WITOLD ET AL "Kinin B1 receptor antagonists with multienzymatic resistance properties" CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY, vol 80, no 4, April 2002 (2002-04), pages 287-292, XP009042834 ISSN 0008-4212 cited in the application Abstract, Table 1, 2nd, 4th and 5th peptides	1-49
A	US 6 075 120 A (MARATHE MANOJ VINAYAK ET AL) 13 June 2000 (2000-06-13) Abstract, Fig 1b, compounds X, XI, compounds of examples	1-49
A	DATABASE UniProt 'Online' 1 November 1996 (1996-11-01), "Rat T-kininogen (T-KG) " XP002314946 retrieved from EBI accession no UNIPROT Q63581 Database accession no Q63581 the whole document	1-49
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2004/034976

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& ANDERSON K P ET AL "PRIMARY STRUCTURE OF A GENE ENCODING RAT T-KININOGEN" GENE (AMSTERDAM), vol 81, no 1, 1989, pages 119-128, ISSN 0378-1119	
A	EP 0 885 899 A (SEIKO INSTR INC) 23 December 1998 (1998-12-23) example 8	1-49
A	MORPURGO M ET AL "SELECTIVE ALKYLATION AND ACYLATION OF ALPHA AND EPSILON AMINO GROUPS WITH PEG N A SOMATOSTATIN ANALOGUE TAILORED CHEMISTRY FOR OPTIMIZED BIOCONJUGATES" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol 13, 2002, pages 1238-1243, XP008040597 ISSN 1043-1802 cited in the application Abstract, Scheme 1, Introduction, paragraph 1 and 2	1-49
A	ZALIPSKY S ET AL "Use ethylene glycol) chemistry of Functionalized Poly(Ethylene Glycol)s for Modification of Polypeptides" POLY(ETHYLENE GLYCOL) CHEMISTRY BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, XX, XX, 1992, pages 347-370, XP002972803 cited in the application Abstract, introduction, Scheme 7	1-49
A	EP 0 318 162 A (TEXACO DEVELOPMENT CORPORATION) 31 May 1989 (1989-05-31) Abstract, claims	1-49
A	US 5 252 714 A (HARRIS ET AL) 12 October 1993 (1993-10-12) cited in the application Col 1, l 5-12, Claim 1	1-49
A	WO 01/62827 A2 (SHEARWATER CORPORATION, SHEN, XIAOMING) 30 August 2001 (2001-08-30) Abstract, p 1, l 5-6, claims	1-49

329

328

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/034976

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15-18, 36,37,46,47 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition
2. ☐ Claims Nos. because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos. because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.
1-49 (all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows

Invention 1 claims 1-49 (all partially)

Peptide of sequence 15 and its conjugates
—

Inventions 2-26 Claims 1-49 (all partially)

Peptides mentioned in claim 40 (except the one of invention 1) and its conjugates Each peptide defines a different invention except

**Peptides 16 and 40 which belong to the same invention,
Peptides 27-32 and 42 which belong to the same invention,
and**

Peptides 33-35, 39 and 41 which belong to the same invention
—

Inventions 27-45 Claims 1-39 and 48 (all partially)

The conjugates of peptides of sequences 5-14, 36-38 and 55-60 (each sequence defines a different invention)
—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/034976

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5834431	A	10-11-1998	AU 6856796 A
		WO 9709346 A1	27-03-1997
			13-03-1997
US 5849863	A	15-12-1998	AU 6911996 A
			27-03-1997
		CA 2230907 A1	13-03-1997
		EP 0848718 A1	24-06-1998
		WO 9709347 A1	13-03-1997
DE 2435642	A	05-02-1976	DE 2435642 A1
			05-02-1976
US 6407207	B1	18-06-2002	NONE
US 6075120	A	13-06-2000	US 5863899 A
			26-01-1999
		US 5843900 A	01-12-1998
		AU 5410994 A	08-06-1994
		CA 2147869 A1	26-05-1994
		CN 1094058 A	26-10-1994
		EP 0671941 A1	20-09-1995
		JP 8503460 T	16-04-1996
		MX 9306988 A1	31-01-1995
		NZ 257477 A	26-07-1996
		PL 304654 A1	09-01-1995
		WO 9411021 A1	26-05-1994
		US 5610140 A	11-03-1997
		ZA 9308014 A	11-07-1994
		AU 660683 B2	06-07-1995
		AU 1875192 A	02-11-1992
		CA 2106677 A1	02-10-1992
		CZ 9302036 A3	13-07-1994
		EP 0586613 A1	16-03-1994
		FI 934300 A	20-10-1993
		HU 65328 A2	02-05-1994
		JP 6508116 T	14-09-1994
		NO 933508 A	30-09-1993
		SK 106193 A3	11-05-1994
		WO 9217201 A1	15-10-1992
		US 5620958 A	15-04-1997
		US 5635593 A	03-06-1997
		US 5416191 A	16-05-1995
EP 0885899	A	23-12-1998	JP 3274076 B2
			15-04-2002
		JP 10175995 A	30-06-1998
		EP 0885899 A1	23-12-1998
EP 0318162	A	31-05-1989	US 4876358 A
			24-10-1989
		US 4826995 A	02-05-1989
		EP 0318162 A2	31-05-1989
		JP 1167316 A	03-07-1989
US 5252714	A	12-10-1993	NONE
WO 0162827	A2	30-08-2001	AU 3859501 A
			03-09-2001
		US 2004109841 A1	10-06-2004
		US 2001044526 A1	22-11-2001

329

330

320

331

PCT/US04/034976

PATENT COOPERATION TREATY

Applicant Amgen Inc
International Application
No PCT/US2004/034976
International Filing Date 22 10 2004
Title ANTAGONISTS OF THE BRADYKININ B1 RECEPTOR

AMENDMENTS UNDER ARTICLE 34

VIA FAX AND
INTERNATIONAL EXPRESS MAIL No EL 732696785 US

International Preliminary Examination Authority
European Patent Office
D-80298 Munich
Germany

Dear Sirs

Applicant submits herewith a substitute sequence listing (pages 1-31), an attorney statement and computer readable form. The amendments to the sequence listing are necessary to correct typographical errors within the sequence listing. More specifically, certain sequences included within Table 3 on pages 42-43 as originally filed were not correctly set out in the present sequence listing. In each instance identified below, the correct sequence was set out in Table 3 as originally filed. Therefore, in each instance identified below the requested amendment to the sequence listing does not go beyond the scope of the specification as filed.

Applicant respectfully requests that the Examiner consider this submission before writing the

331

332

PCT/US04/034976

International Preliminary Examination Report, and that the Examiner issue an IPER indicating a favorable opinion as to the patentability of the Applicant's invention

The changes to the sequence listing are identified below

SEQUENCE ID NOS 1-9 No amendments

SEQUENCE ID NO 10

~~Leu~~LeuLys Lys Arg Pro Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

SEQUENCE ID NO 11-14 No amendments

SEQUENCE ID NO 15

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 16

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 17

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 18

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 19-20 No amendments

SEQUENCE ID NO 21

~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 22

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 23

~~Leu~~Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 24

~~Leu~~Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 25

~~Leu~~Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 26

~~Leu~~Lys Xaa Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 27-31 No amendments

SEQUENCE ID NO 32

Cys Gly Gly Gly Gly Gly ~~Leu~~LeuLys Lys Arg Pro Pro Gly
Xaa Ser Xaa Ile

SEQUENCE ID NO 33-38 No amendments

SEQUENCE ID NO 39

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Xaa ~~Leu~~LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa
Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 40

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Xaa ~~Leu~~LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa
Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 41

Cys Gly Gly Gly Gly Gly ~~Leu~~LeuLys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa
Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 42-43 No amendments

SEQUENCE ID NO 44

Xaa ~~Leu~~LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 45

Xaa ~~Leu~~LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 46

Xaa ~~Leu~~LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 47

Xaa ~~Leu~~LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 48

Xaa ~~Leu~~LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 49 No amendments

SEQUENCE ID NO 50

~~Leu~~LeuLys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

SEQUENCE ID NO 51-52 No amendments

SEQUENCE ID NO 53

Xaa ~~Leu~~LeuLys Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

SEQUENCE ID NO 54

Xaa ~~Leu~~LeuLys Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

SEQUENCE ID NO 55

~~Leu~~LeuLys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile

SEQUENCE ID NO 56

~~Leu~~LeuLys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile

SEQUENCE ID NO 57-58 No amendments

SEQUENCE ID NO 59

~~Leu~~Lys Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

SEQUENCE ID NO 60

~~Leu~~Lys Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

In conclusion, Applicant respectfully requests the Examiner to consider the amendments and remarks and issue an International Preliminary Examining Report favorable to the patentability of the present invention

Respectfully submitted,

Date February 24, 2006

Robert L Sharp
Agent for Applicant
Registration No 45,609
Phone 805-447-5992

U S Patent Operations/RLS
M/S 28-2-C
AMGEN INC
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

Solicitante Amgen Inc

Solicitud Internacional

No PCT/US2004/034976

Fecha de presentación internacional 22 10 2004

Título ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR B1 DE BRADIQUININA

REFORMAS DE CONFORMIDAD CON EL ARTÍCULO 34VIA FAX YCORREO EXPRESO INTERNACIONAL No EL 732696785 US

Administración encargada del Examen Preliminar Internacional

Oficina Europea de Patentes

D-80298 Munich

Alemania

Estimados Señores

Por medio de la presente el solicitante presenta un listado de secuencia sustituto (páginas 1 - 31), una declaración del apoderado y un formato legible por computador Las reformas al listado de secuencia son necesarias para corregir errores tipográficos en el listado de secuencia Más específicamente, ciertas secuencias incluidas en la Tabla 3 en las páginas 42-43 presentadas originalmente no fueron definidas correctamente en el presente listado de secuencia En cada uno de los casos identificados a continuación, la secuencia correcta fue definida en la Tabla 3 presentada originalmente Por consiguiente, en cada uno de los casos identificados a continuación la reforma solicitada no excede el alcance de la descripción tal como fue presentada

El solicitante respetuosamente le solicita al Examinador considerar este escrito antes de redactar el Informe del Examen Preliminar Internacional y que el Examinador otorgue un IEPI que

establezca un concepto favorable respecto a la patentabilidad de la
invención de solicitante

Los cambios al listado de secuencia se identifican a
continuación

ID de Secuencia NOS 1-9 Sin reformas

ID de Secuencia NO 10

~~Leu~~Lys Lys Arg Pro Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

ID de Secuencia NO 11-14 Sin reformas

ID de Secuencia NO 15

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 16

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 17

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 18

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 19-20 Sin reformas

ID de Secuencia NO 21

~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 22

Xaa ~~Leu~~Lys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 23

~~Leu~~Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 24

~~Leu~~Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 25

~~Leu~~Lys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 26

~~Leu~~Lys Xaa Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 27-31 Sin reformas

ID de Secuencia NO 32

Cys Gly Gly Gly Gly GLy ~~Leu~~Lys Lys Arg Pro Pro Gly Xaa Ser Xaa
Ile

ID de Secuencia NO 33-38 Sin reformas

ID de Secuencia NO 39

Cys Gly Gly Gly Gly GLy Xaa LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 40

Cys Gly Gly Gly Gly GLy Xaa LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 41

Cys Gly Gly Gly Gly GLy LeuLys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 42-43 Sin reformas

ID de Secuencia NO 44

Xaa LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 45

Xaa LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 46

Xaa LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 47

Xaa LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 48

Xaa LeuLys Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 49 Sin reformas

ID de Secuencia NO 50

LeuLys Xaa Arg Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Xaa

ID de Secuencia NO 51-52 Sin reformas

ID de Secuencia NO 53

Xaa LeuLys Arg Xaa Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Ile

ID de Secuencia NO 54

Xaa LeuLys Arg Xaa Pro Xaa Gly Xaa Ser Xaa Ile

ID de Secuencia NO 55

LeuLys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile

ID de Secuencia NO 56

LeuLys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Xaa Ile

ID de Secuencia NO 57-58 Sin reformas

ID de Secuencia NO 59

LeuLys Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

ID de Secuencia NO 60

~~Leu~~Lys Arg Xaa Pro Gly Xaa Ser Xaa Ile

En conclusión, el Solicitante respetuosamente solicita al Examinador considerar las reformas y observaciones y expedir un Informe del Examen Preliminar Internacional favorable para la patentabilidad de la presente invención

Fecha Febrero 24 de 2006

Respetuosamente presentado,

Robert L Sharp

Agente del Solicitante

Registro No 45,609

Teléfono 805-447-5992

U S Patents Operations

M/S 28-2-C

AMGEN INC

One Amgen Center Drive

Thousand Oaks, California 91320

PC Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		339
(21) N° de solicitud		(51) Int Cl A81K 47/48		
22) Fecha de solicitud		(71) Solicitante(s) AMGEN, INC		
(30) Prioridad	(31) 80/513,913 80/538,929 10/972 238	(32) 22/10/2003 24/01/2004 21/10/2004	(33) US US US	(72) Inventor(es) GORDON NG Y OTROS
				(74) Apoderado EMILIO FERRERO
(85)	Fecha límite inicio fase nacional 22/05/2006		(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha. 12/05/2005	
	Fecha de presentación de la solicitud 22/10/2004		N° publicación WO 2005/042027 A2	
	No de solicitud PCT/US2004/034976			
(54) Título ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR B1 DE BRADIQUININA				

Reivindicación(es)

- 1

Una composición de materia de la fórmula F-[(X¹) (Y¹)_n] o una sal fisiológicamente aceptable de esta en donde

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

F es un vehículo covalentemente unido X¹ o Y¹

L¹ y L² son independientemente en cada caso ausentes o ligadores que tienen de 0 a 9 residuos de aminoácido,

N es 0 a 3, y

P¹ y, si están presentes, P² son independientemente en cada caso antagonistas de péptido o del receptor de bradiquinina B1
- 2

Una composición de materia de la fórmula F' R_z o una sal fisiológicamente aceptable de esta, en donde

F' es un vehículo multivalente,

R es independientemente en cada caso -(X¹)-(Y¹)_n

en donde R está covalentemente unido a F',

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

L¹ y L² son independientemente en cada caso ausentes o ligadores que tienen de 0 a 9 residuos de aminoácido,

n es 0 a 3

z es 2 a 8 y

P¹ y P² son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor de bradiquinina B1
- 3

La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde P¹ y P² son independientemente en cada caso antagonistas de péptido del receptor B1 de bradiquinina seleccionado del grupo de péptidos que

consiste de los péptidos mostrados en la ID de SEC No 5-26, 43-60, y derivados de estos
- 4

La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde X¹ es un péptido que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de péptidos mostrados en las ID de SEC No 27 41 y derivados de estas
- 5

La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 2 en donde n es 1 y P² es un péptido que tiene una secuencia como se muestra en la ID de SEC No 42.
- 6

La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 2 en donde n es 0
- 7

La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde P¹ y P² son independientemente en cada caso antagonistas de péptido de los grupos de péptidos que consisten de péptidos definidos por la fórmula

NH₂-a⁰a¹a²a³a⁴a⁵a⁶a⁷a⁸a⁹a¹⁰a¹¹a¹²a¹³a¹⁴-COOH

en donde

a⁰ es un aminoácido aromático, alifático, heterocíclico, o alicíclico, básico o neutro, dipéptido básico, o están ausentes,

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

a⁵ es Ser

a⁶ a⁷ y a⁸ son independientemente en cada caso aminoácidos aromáticos alifáticos, heterocíclicos, o alicíclicos siempre y cuyo al menos uno de a⁶ a⁷ y a⁸ se seleccionen de Chg, Cpg, Igl, Iglb Nlg y Nlgb de la configuración D-o L- y

339

340

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 06 - 36,137
FECHA MAYO 15 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 08-047688-00000-0000
Fec: 2008-05-18 17:48:44 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTE
Evo 370 FASE NACIONAL II
Act 411 PRESENTACION Folios: 399

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54982575	15/05/2006	47,972,500 00

***** C O N C E P T O *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	463,000 00
		TOTAL	463,000 00

SON CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

660 15193 841 002 5

341

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No	6 47666
	Solicitud internacional	US2004/034976
	Fecha inicio fase nacional	22/05/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No	Q797

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que

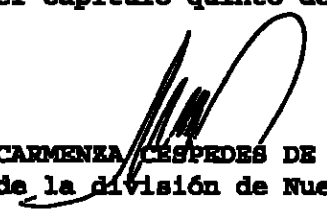
1 Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art 36 2 b) del tratado PCT

2 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486

3 La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5 2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No 10 de 2001.


ALIX CARMONA CRESPO DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 17 ABO 2006
adpall

notes