

ANÁLOGOS DE PÉPTIDOS DE CONOTOXINA Y USOS PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR Y DE LAS AFECCIONES INFLAMATORIAS

Referencia al listado de secuencias entregado electrónicamente

Esta solicitud incorpora por referencia un listado de secuencias entregado con esta solicitud como un archivo de texto titulado "SEQ_LISTING_14520-002-228.txt" creado el 3 de enero de 2019 y con un tamaño de 66,707 bytes.

1. Campo de la Invención

En el presente documento se proporcionan análogos de péptidos de alfa-conotoxina, los cuales incluyen a los análogos de péptidos de alfa-conotoxina que se unen de una forma covalente al polietilén glicol (PEG), y composiciones farmacéuticas de tales análogos de péptidos de alfa-conotoxina. También se proporcionan en este documento los métodos para tratar o prevenir una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) que contiene $\alpha 9$ (por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del nAChR) en un sujeto.

2. Antecedentes de la Invención

Los caracoles marinos depredadores del género *Conus* tienen venenos que son ricos en péptidos neurofarmacológicamente activos (péptidos de conotoxina o conotoxinas) (Olivera et al, 1990, Science 249: 257-263). Hay aproximadamente 500 especies de *Conus*, y entre aquellos que se han examinado hasta ahora, una característica conservada es la presencia de péptidos de alfa-conotoxina en su veneno. Los péptidos de alfa-conotoxina nativos son péptidos altamente reticulados con disulfuro con un patrón de puente de disulfuro de C1 a C3 y de C2 a C4 (Azam y McIntosh, 2009, Acta Pharmacol. Sin. 30: 771-783).

Los péptidos de alfa-conotoxina generalmente han demostrado ser antagonistas del receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) (Nicke et al, 2004, Eur. J. Biochem. 271: 2305-2319). Los nAChR son canales de iones activados por ligandos pentaméricos ensamblados a partir de una o más subunidades α ($\alpha 1$ a $\alpha 10$) ya sea solas o junto con una o más subunidades que no sean α ($\beta 1$ a $\beta 4$) (Sine y Engel, 2006, Nature 440: 448-455).

Las subunidades de nAChR $\alpha 9\alpha 10$ se expresan en diversos tejidos. En el oído interno, los nAChR $\alpha 9\alpha 10$ median la transmisión sináptica entre las fibras olivococleares eferentes y las células ciliadas de la cóclea (Vetter et al, 1999, Neuron 23: 93-103). Las subunidades $\alpha 9\alpha 10$ también se encuentran en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Lips et al, 2002, Neuroscience 115: 1-5), en los linfocitos (Peng et al, 2004, Life. Sci. 76: 263-280), en los queratinocitos de la piel (Nguyen et al, 2000, Am J. Pathol. 157: 1377-1391), y en la pars tuberalis de la pituitaria (Elgoyhen et al, 1994, Cell 79: 705-715; Zuo et al, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 96: 14100-14105).

Los compuestos que tienen un perfil farmacológico que incluye la actividad antagonista de $\alpha 9\alpha 10$ previenen o atenúan la expresión del dolor en varios modelos de roedores, el cual incluye el dolor neuropático inducido por la quimioterapia, por la lesión traumática de los nervios, y por la diabetes (véase Hone y McIntosh, 2018, FEBS Lett. 592: 1045-1062).

El péptido de conotoxina nativo Rg1A tiene la secuencia de aminoácidos Gly-Cys-Cys-Ser-Asp-Pro-

Arg-Cys-Arg-Tyr-Arg-Cys-Arg (SEQ ID NO: 1) (Ellison et al, 2008, J. Mol. Biol. 377: 1216-1227). Se ha demostrado que el péptido de alfa-conotoxina RgIA bloquea la actividad de nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Romero et al, 2017, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 14: E1825-E1832).

RgIA pertenece a la familia de α -conotoxinas α -4/3. La estructura nativa de RgIA se caracteriza por dos bucles intra-cisteína compactos definidos por dos enlaces de disulfuro formados entre Cys2-Cys8 (a veces denominado como CysI-CysIII) y Cys3-Cys12 (a veces denominado como CysII-CysIV) (Ellison et al, 2008, J. Mol. Biol. 377: 1216-1227; Armishaw, 2010, Toxins 2: 1471-1499). En las α -conotoxinas, el primero y el segundo residuos de cisteína están siempre adyacentes, pero el número de residuos de aminoácidos entre la segunda y la tercera cisteínas, y entre el tercero y el cuarto residuos de cisteína puede variar. Esto da lugar a dos bucles de aminoácidos interventores denotados como bucle 1 o el bucle m y bucle 2 o el bucle n. En RgIA, el bucle 1 contiene 4 aminoácidos y el bucle 2 contiene 3 aminoácidos. Los enlaces de disulfuro y, por lo tanto, la estructura secundaria de las α -conotoxinas, son inestables y están sujetos a un reordenamiento (Armishaw, 2010, Toxins 2: 1471-1499).

Los dos enlaces de disulfuro del α -conopéptido están sujetos a un reordenamiento y pueden formar estructuras tridimensionales alternativas, las cuales incluyen una forma de cinta (enlaces de disulfuro de Cys2-Cys12 y Cys3-Cys8) y una forma de esfera (enlaces de disulfuro de Cys2-Cys3 y Cys8-Cys12). Mientras que la forma nativa o globular del péptido es activa en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$, se cree que ni la forma de cinta ni la forma de esfera son activas (Dekan et al, 2011, J. Am. Chem. Soc. 133: 15866-15869; Armishaw et al, 2006, J. Bio. Chem. 281: 14136-14143).

Hargittai et al evaluaron cuatro derivados con puente de lactama de la alfa-conotoxina SI, y sólo uno de los cuatro derivados con puente de lactama no perdió una actividad significativa en el enlace a las células BC3H1 (Hargittai et al, 2000, J. Med. Chem. 43: 4787-4792). Bondebjerg et al evaluaron los miméticos de tioéter sintetizados de la alfa-conotoxina GI y encontraron que los dos isómeros ensayados tenían una actividad farmacológica significativamente menor que el péptido nativo (Bondebjerg et al, 2003, ChemBioChem 4: 186-194). Se evaluaron los análogos de dicarba no reducibles de alfa-lml y en ambos casos se encontró que tienen una reducción de aproximadamente 10 veces en la actividad farmacológica (MacRaild et al, 2009, J. Med. Chem. 52: 755-762). Ciertos derivados de selenocisteína y cistationina específicos del lml conservan la actividad en el bloqueo del nAChR $\alpha 7$ de la rata (Dekan et al, 2011, J. Am. Chem. Soc. 133: 15866-15869; Armishaw et al, 2006, J. Bio. Chem. 281: 14136-14143).

Van Lierop evaluó las sustituciones de dicarba de los enlaces de disulfuro de la alfa-conotoxina Vc1.1 y encontró que los análogos de dicarba [2, 8]-cis y [2, 8]-trans no tenían actividad en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de la rata, mientras que los isómeros [3, 16]-cis y [3, 16]-trans de Vc1.1 habían reducido en gran medida (de 10 a 100 veces) la actividad en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de la rata (van Lierop et al, 2013, ACS Chemical Biology 8: 1815-1821). Yu et al crearon los derivados enlazados al péptido N-terminal a C-terminal del Vc1.1 que tenían uno o más residuos de cisteína sustituidos con His o Phe. Estos derivados habían reducido significativamente la potencia (de 20 a 40 veces más baja) en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano en relación con el Vc1.1 nativo (Yu et al, 2015, Sci. Rep. 5: 13264). En un estudio separado por el mismo grupo, la sustitución de Cys2 por His y de Cys8 por Phe en el Vc1.1 en ausencia de la ciclación de N- a C-terminal también dio

como resultado la pérdida de la actividad en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano, a pesar del análisis que demostró la conservación de la estructura secundaria (Tabassum et al, 2017, ACS Omega 2: 4.621-4631).

Se han explorado esfuerzos similares para reemplazar los enlaces de disulfuro en RgIA con enlaces de dicarba (Chhabra et al, 2014, J. Med. Chem. 57: 993-9944). Aunque este estudio encontró que los análogos de dicarba de RgIA eran sintéticamente factibles, las comparaciones estructurales basadas en la RMN del RgIA nativo con los análogos de dicarba demostraron diferencias estructurales significativas en el segundo bucle de los péptidos. En consonancia con estas diferencias estructurales y observaciones del Vc1.1 relacionado, los análogos de dicarba [2, 8]-cis y [2, 8]-trans del RgIA no tuvieron ninguna actividad en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de la rata, mientras que los isómeros [3, 12]-cis y [3, 12]-trans tuvieron ambas reducciones mayores de 100 veces en la inhibición de las corrientes de $\alpha 9\alpha 10$ provocadas por la acetilcolina. Chhabra et al no evaluaron las actividades de los análogos de RgIA con puentes de dicarba en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano.

Knuhtsen et al (Knuhtsen et al, Chemical Science, 2019, artículo anticipado) estudiaron los análogos de la alfa-conotoxina GI en donde los enlaces de disulfuro de Cys2-Cys7 o Cys3-Cys13 fueron reemplazados con los puentes de 1, 2, 3-triazol 1, 5-disustituido.

El RgIA nativo tiene aproximadamente 300 veces menor afinidad para el ser humano que el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de la rata, y esta diferencia en la afinidad se ha asignado a la variación en la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa 9 dentro del bolsillo de enlace de RgIA (Azam et al, 2015, Mol. Pharmacol. 87: 855-864).

Se han reportado análogos de péptidos de conotoxina del RgIA (Publicación Internacional de Patente No. WO 2008/011006; Romero et al, 2017, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 14: E1825-E1832; Publicación Internacional de Patente No. WO 2016/073949).

Los estudios han demostrado un mayor grado de flexibilidad estructural en el bucle 2 de RgIA, en especial alrededor del término carboxilo, y la importancia de los residuos del bucle 2 en las interacciones de enlace al receptor humano (Clark et al, 2008, FEBS Lett. 582 (5): 597-602). La espectroscopia de RMN también indica que Cys12 de RgIA puede interactuar con Tyr10 en el péptido de tipo silvestre o nativo (Ellison et al, 2008, J. Mol. Biol. 377: 1216-1227; Armishaw, 2010, Toxins 2: 1471-1499).

Los péptidos de conotoxina y sus análogos son inhibidores competitivos del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y se enlazan en el sitio de enlace a la ACh, es decir, en la interfaz entre las subunidades adyacentes. La interfaz de las subunidades entierra hasta un radio de sonda de 1.4 Å un área de superficie de ~ 1300 Å², en donde estas conotoxinas interactúan con los residuos entre las subunidades que abarcan distancias de menos de 5 Å (Hansen et al, 2005, EMBO J., 24 (20): 3635-3646).

La comparación de aminoácidos con otras subunidades de nAChR conocidas indica que los nAChR $\alpha 9\alpha 10$ están estrechamente relacionados con el nAChR $\alpha 7$ (Elgoyhen et al, 1994, Cell 79 (4): 705-715; Lustig et al, 2001, Genomics, 73 (3): 272-283; Sgard et al, 2002, Mol. Pharmacol. 61 (1): 150-159). El nAChR $\alpha 7$ tiene efectos pleiotrópicos en el sistema nervioso (Ellison et al, 2008, J. Mol. Biol. 377: 1216-1227; Armishaw, 2010, Toxins 2: 1471-1499).

La unión no covalente o covalente a los polímeros de polietilen glicol (PEGilación) puede cambiar

las propiedades físicas y químicas de una biomolécula, tal como un péptido, tales como su conformación, su enlace electrostático, y su hidrofobicidad (Veronese y Mero, 2008, BioDrugs, 22: 315-329; véase también Harris et al, 2001, Clin. Farmacokinet. 40: 539-551).

La PEGilación de una proteína terapéutica a menudo conduce a una pérdida en su afinidad de enlace debido al impedimento estérico del polímero de PEG a la interacción de enlace del fármaco-blanco (Fishburn, 2008, J. Pharm. Sci. 97: 4167-4183). Las proteínas terapéuticas PEGiladas pueden perder la actividad biológica o potencia, ya sea a través de los efectos estéricos o bien a través de las interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas entre el PEG y los dominios hidrofóbicos dentro de la proteína (Parrott y DeSimone, 2011, Nat. Chem. 4: 13-14).

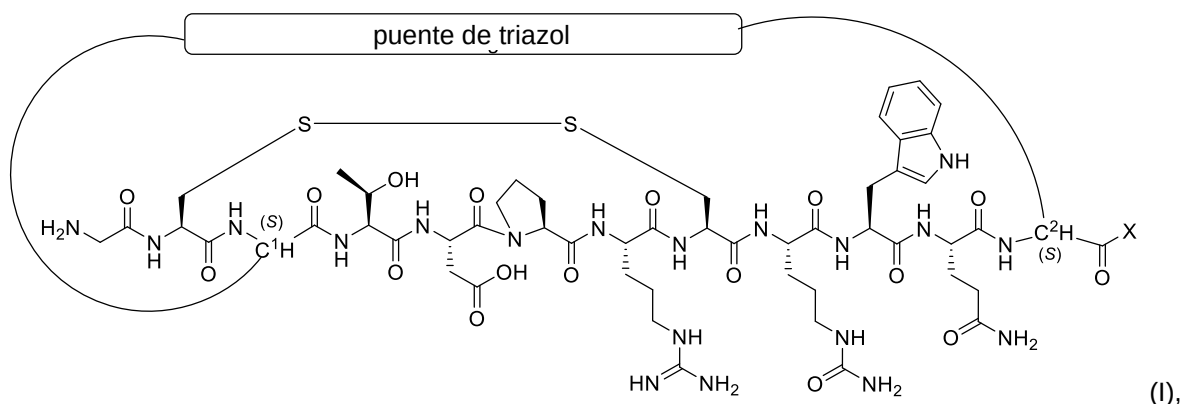
Los estudios han indicado que los antagonistas de los nAChR que contienen $\alpha 9$ exhiben una actividad analgésica en los modelos animales de dolor neuropático (Hone, et al, 2018, British Journal of Pharmacology, 175: 1915-1927). Los estudios también han demostrado que la inhibición de la los nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en los roedores previene el dolor neuropático inducido por la quimioterapia (Romero et al, 2018, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 114 (10): E1825-E1832). Véase también, Mohammadi y Christie, 2014, Molecular Pain, 10: 64-72; Simard et al, 2013, Immunology and Cell Biology, 91: 195-200.

Existe una necesidad médica no satisfecha de análogos de péptidos de conotoxina con una estabilidad metabólica mejorada mientras que se mantenga suficiente actividad antagonista en los nAChR que contienen $\alpha 9$. Los análogos de péptidos de conotoxina de la presente invención satisfacen estas necesidades.

La citación de una referencia en este documento no se deberá interpretar como una admisión de que esta sea el estado de la técnica anterior para la presente divulgación.

3. Breve Descripción de la Invención

La presente divulgación proporciona análogos de péptidos de conotoxina de la fórmula (I) (SEQ ID NO: 93):

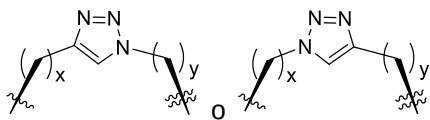


o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos,
en donde

X es X_{AA}^1 o $X_{AA}^1 X_{AA}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-Me-Gly, D-Tyr o N-Me-Tyr;

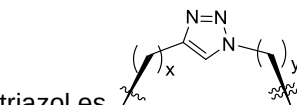
en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida.

En una modalidad específica, el puente de triazol es

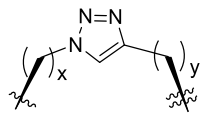


, en donde la línea ondulada individual (~~~~) indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles (~~~~) indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina; y en donde x es 1, 2, 3 o 4; e y es 2, 3 o 4.

En una modalidad específica, en donde el puente de triazol es



En una modalidad específica, el puente de triazol es



En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3.

En una modalidad específica, x es 1.

En una modalidad específica, y es 2 o 3.

En una modalidad específica, y es 3.

En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3, e y es 2 o 3.

En una modalidad específica, x es 1, e y es 3.

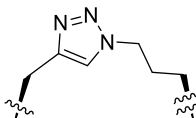
En una modalidad específica, x es 2, e y es 3.

En una modalidad específica, x es 2, e y es 2.

En una modalidad específica, x es 1, e y es 3.

En una modalidad específica, x es 2, e y es 2.

En una modalidad específica, el puente de triazol es



, en donde la línea ondulada individual (~~~~) indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles (~~~~) indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina.

En una modalidad específica, X es X_{AA}¹.

En una modalidad específica, X es X_{AA}¹X_{AA}².

En una modalidad específica, X_{AA}¹ se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, D-Tyr y Phe.

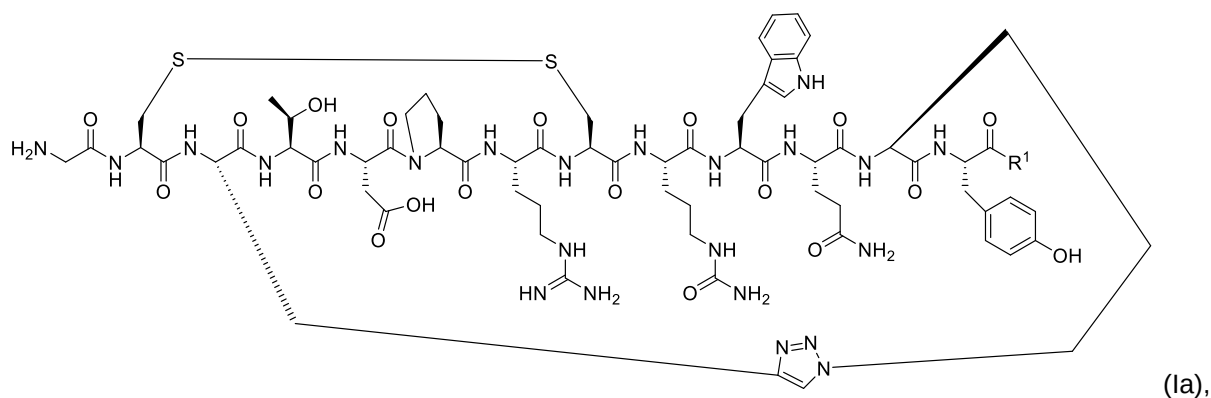
En una modalidad específica, X es Tyr.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es OH.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es NH₂.

En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ia) (SEQ ID NO:

94)



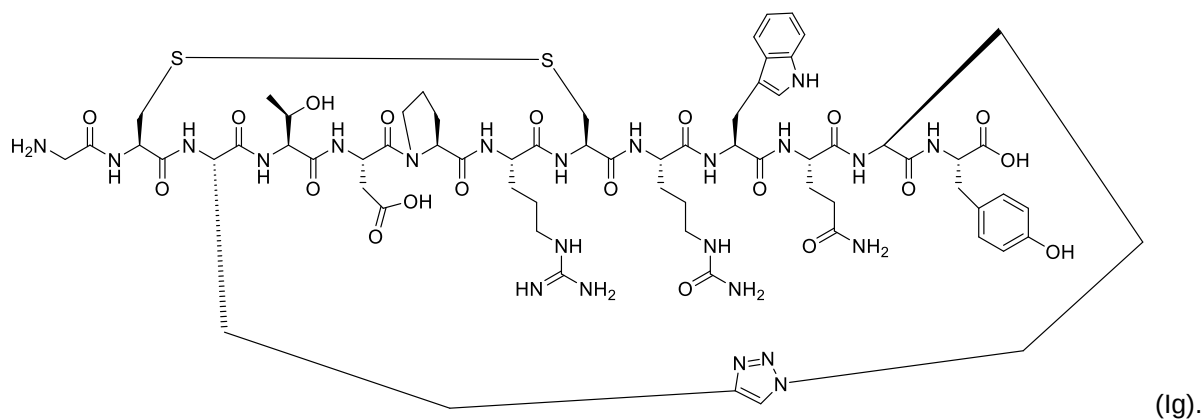
en donde R^1 es OH o NH_2 .

En una modalidad específica, R^1 es OH.

En una modalidad específica, R^1 es NH_2 .

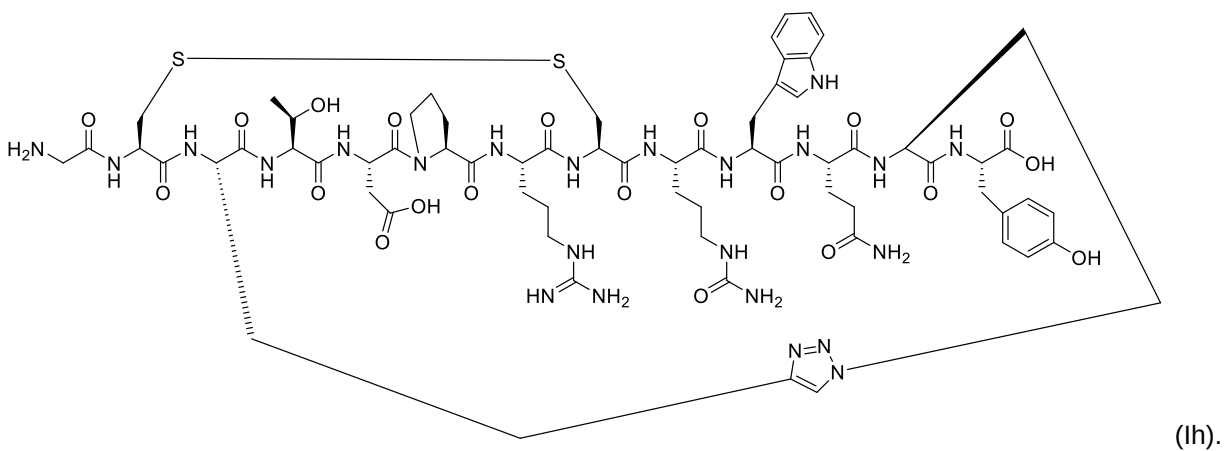
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ig) (SEQ ID NO:

30):

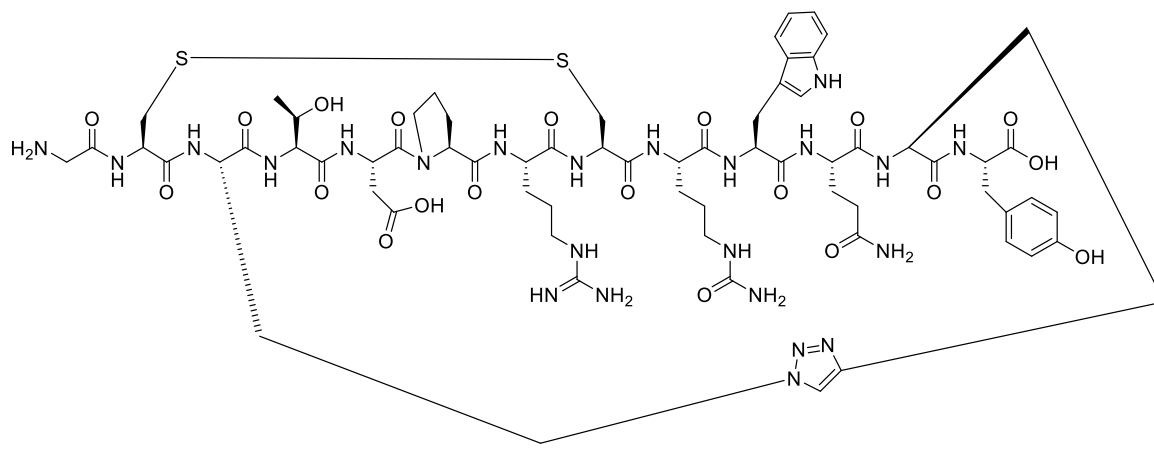


En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ih) (SEQ ID NO:

33):

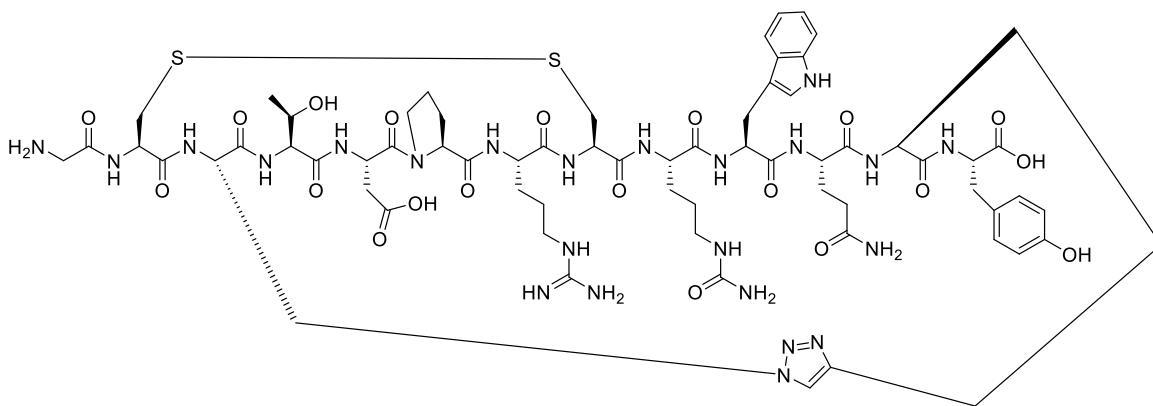


En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (li) (SEQ ID NO: 36):



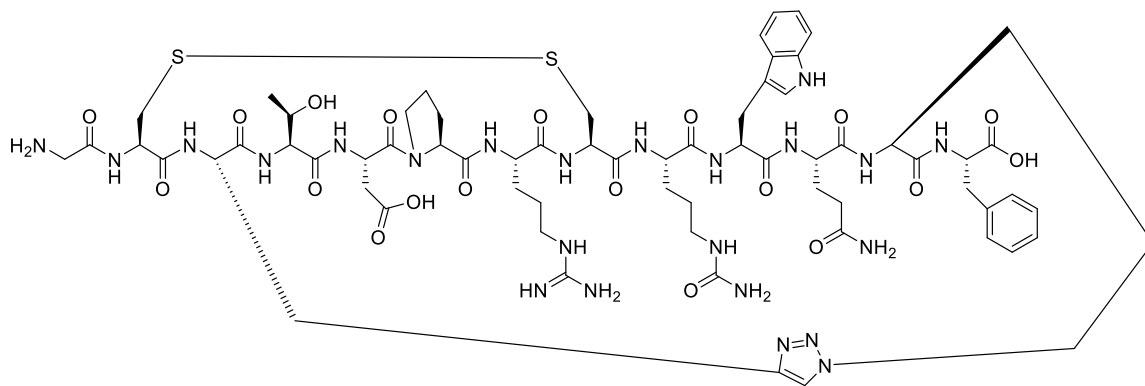
(li).

En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (lk) (SEQ ID NO: 42):



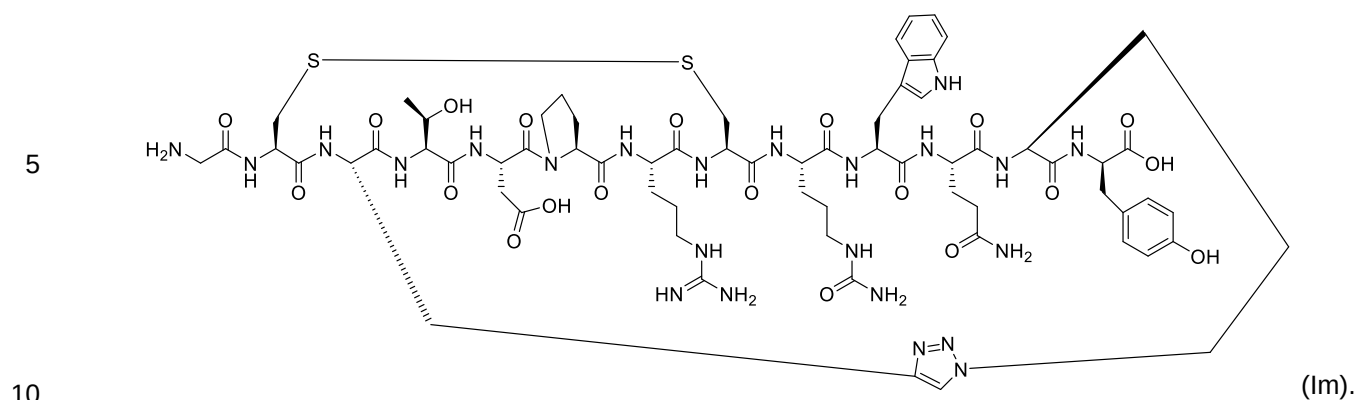
(lk).

En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (ll) (SEQ ID NO: 45):



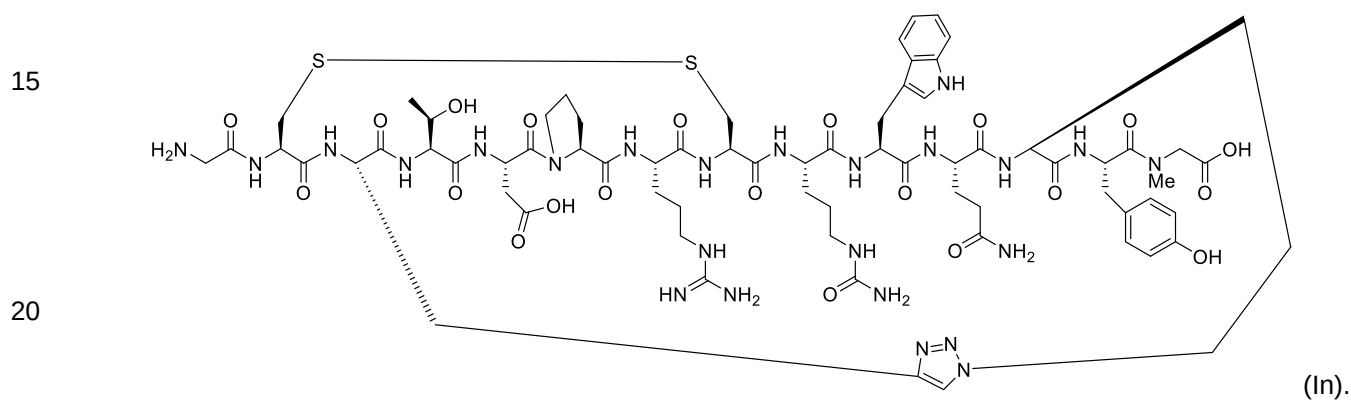
(ll).

En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (lm) (SEQ ID NO: 48)



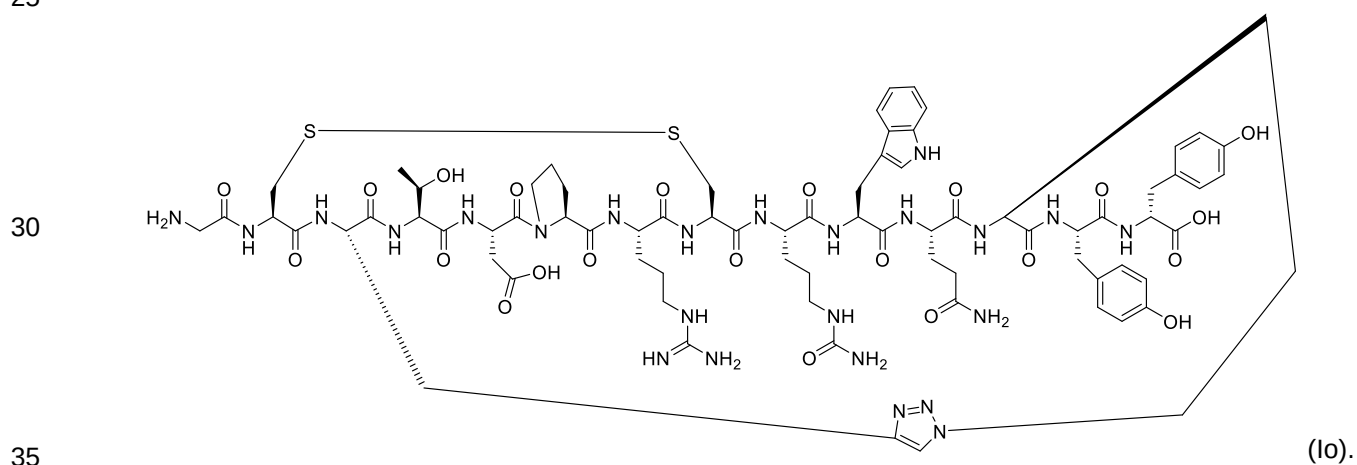
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (In) (SEQ ID NO:

51)



En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Io) (SEQ ID NO:

54)

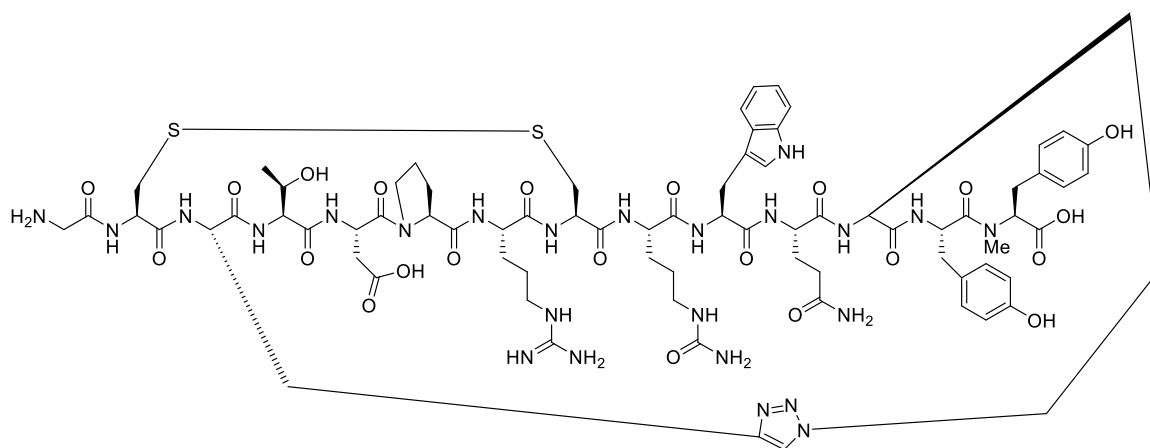


En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ip) (SEQ ID NO:

57)

5

10

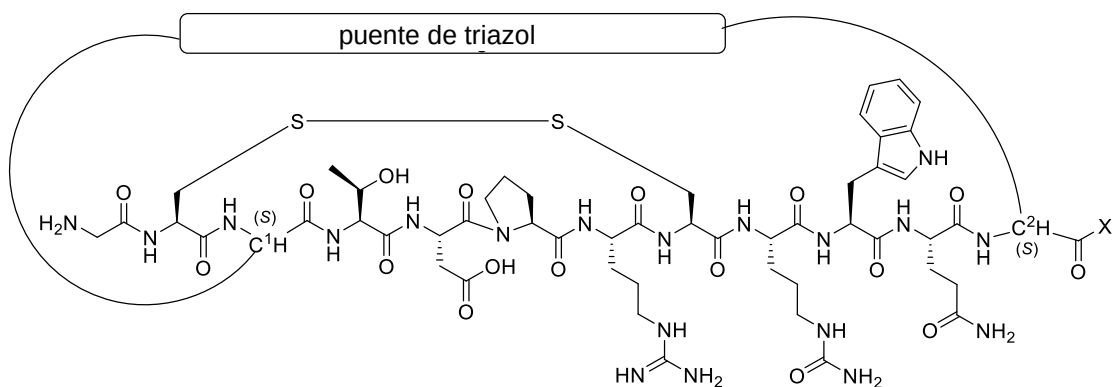


(Ip).

También se proporcionan en este documento los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (I) (SEQ ID NO: 93):

15

20



(I),

en donde

25

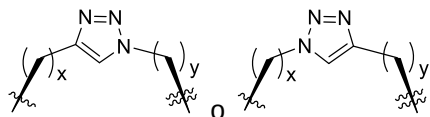
X es X_{AA^1} o $X_{AA^1}X_{AA^2}$; en donde X_{AA^1} es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA^2} es N-Me-Gly, D-Tyr o N-Me-Tyr;

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida; y

30

en donde el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente directamente o por medio de un grupo de enlace a uno o más polímeros de polietilen glicol (PEG).

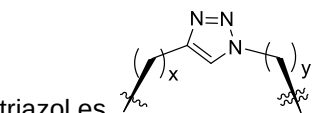
En una modalidad específica, el puente de triazol es



35

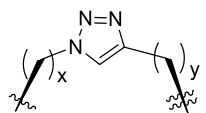
, en donde la línea ondulada individual (~~~~) indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles (~~~~) indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina; y en donde x es 1, 2, 3 o 4; e y es 2, 3 o 4.

En una modalidad específica, en donde el puente de triazol es



5

En una modalidad específica, el puente de triazol es



En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3.

En una modalidad específica, x es 1.

En una modalidad específica, y es 2 o 3.

10

En una modalidad específica, y es 3.

En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3, e y es 2 o 3.

En una modalidad específica, x es 1, e y es 3.

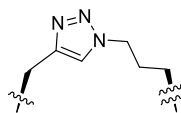
En una modalidad específica, x es 2, e y es 3.

En una modalidad específica, x es 2, e y es 2.

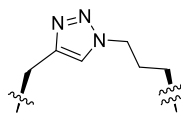
15

En una modalidad específica, x es 1, e y es 3.

En una modalidad específica, x es 2, e y es 2.



20

En una modalidad específica, el puente de triazol es , en donde la línea ondulada individual (~~~~) indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles (~~~~) indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina.

En una modalidad específica, X es X_{AA}¹.

En una modalidad específica, X es X_{AA}¹X_{AA}².

25

En una modalidad específica, X_{AA}¹ se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, D-Tyr y Phe.

En una modalidad específica, X es Tyr.

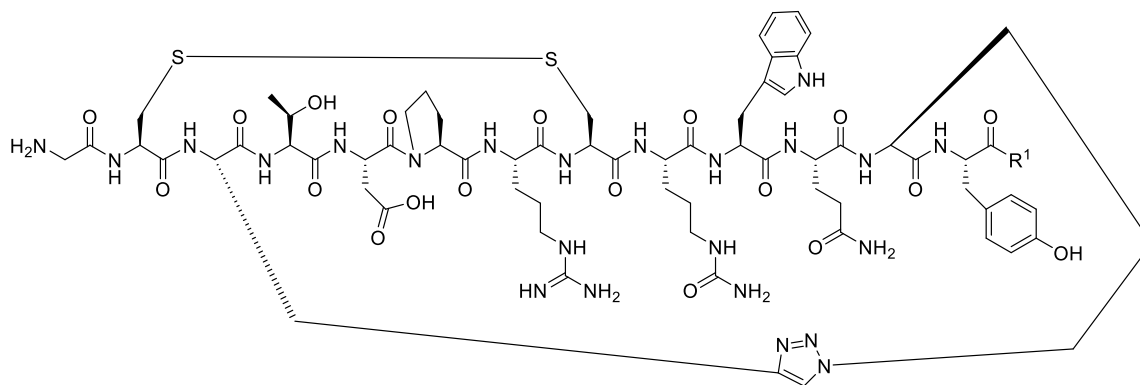
En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es OH.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es NH₂.

En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ia) (SEQ ID NO:

30

94)



35

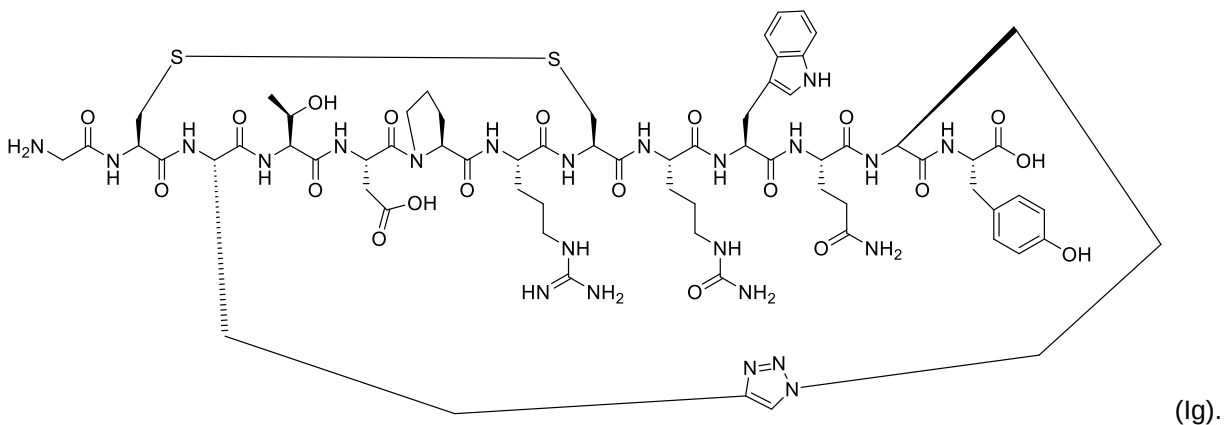
(Ia).

En una modalidad específica, R^1 es OH.

En una modalidad específica, R^1 es NH_2 .

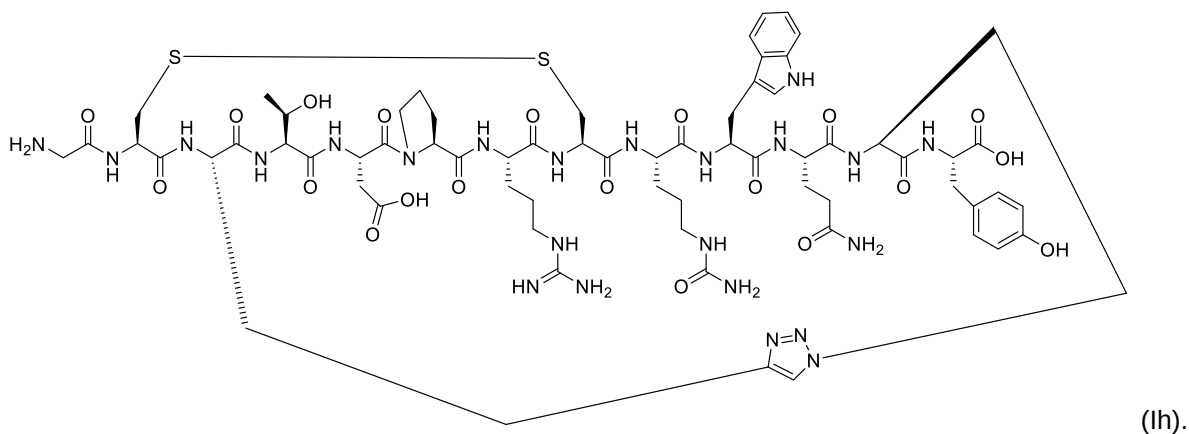
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ig) (SEQ ID NO:

30):



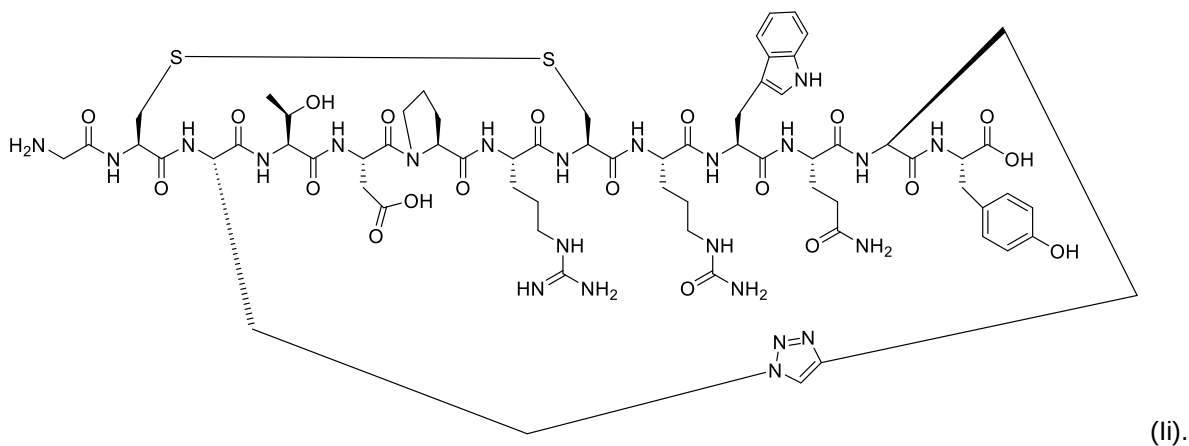
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ih) (SEQ ID NO:

33):

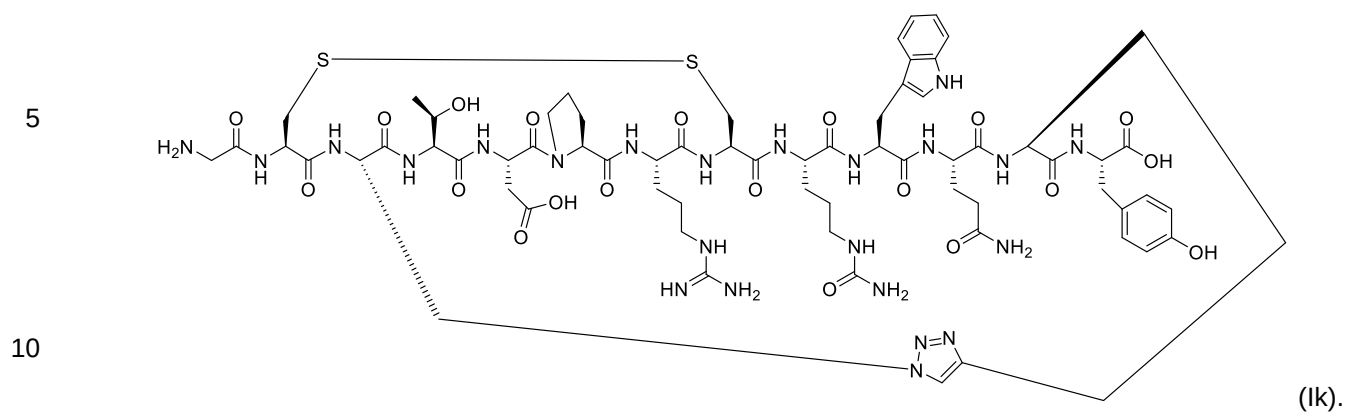


En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ii) (SEQ ID NO:

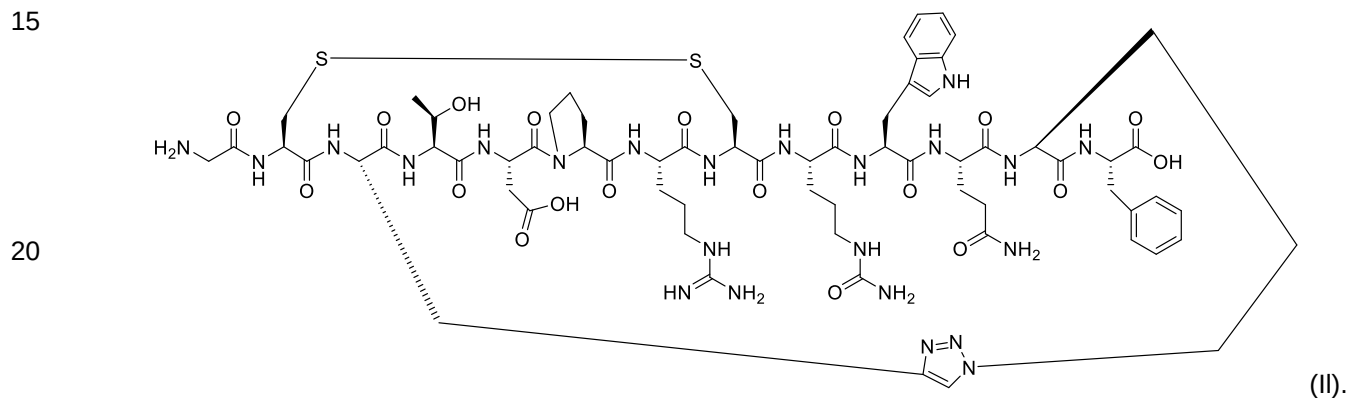
36):



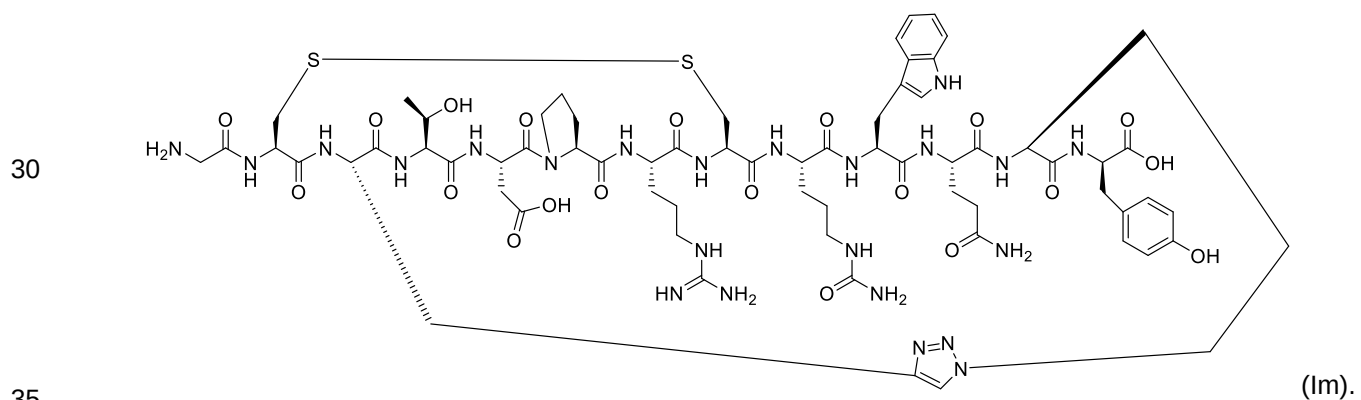
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ik) (SEQ ID NO: 42):



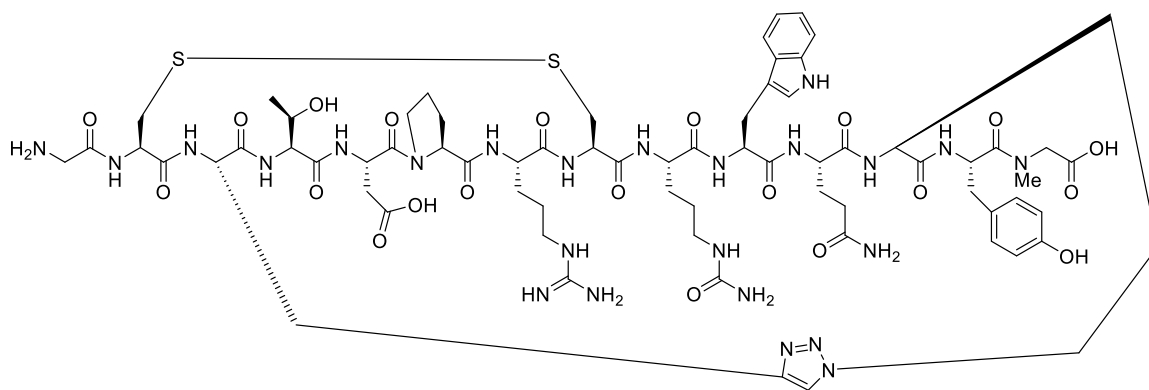
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (II) (SEQ ID NO: 45):



En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Im) (SEQ ID NO: 48)

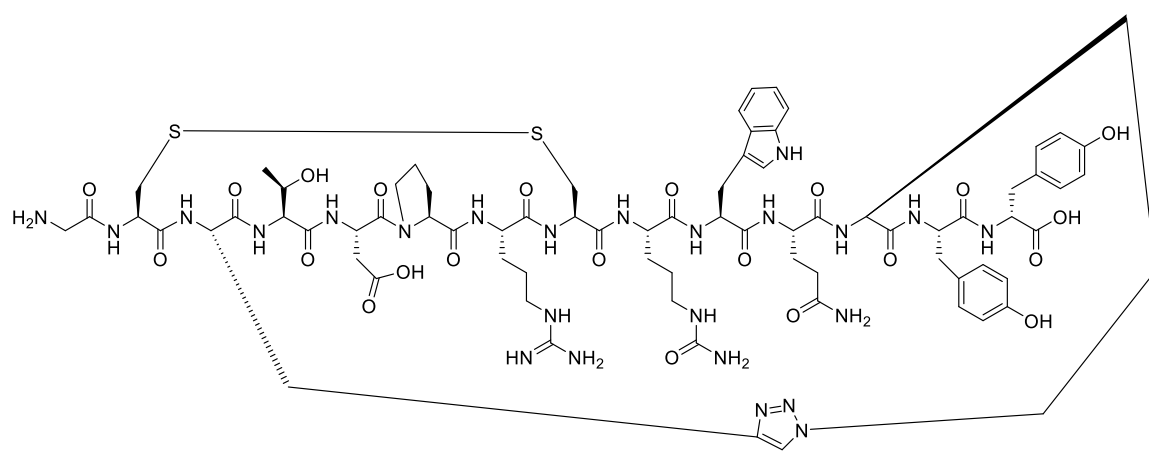


En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (In) (SEQ ID NO: 51)



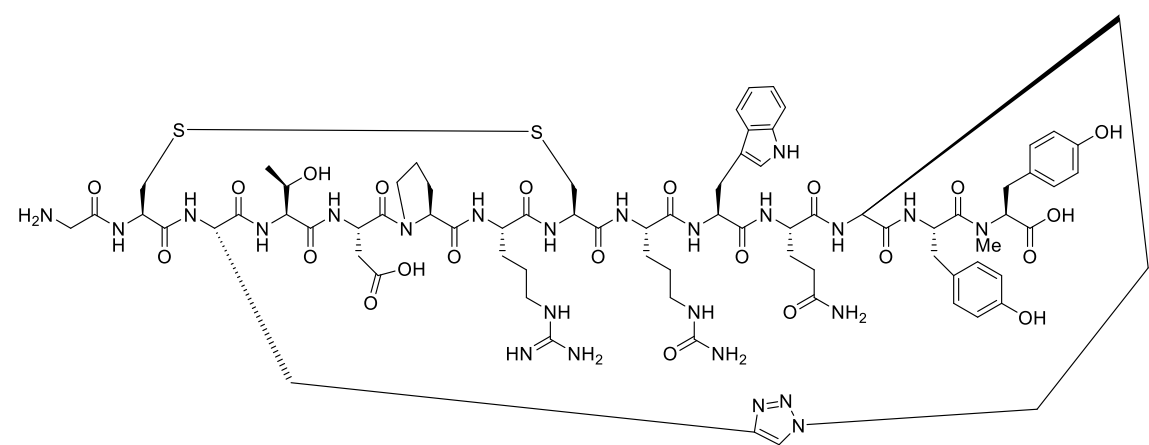
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Io) (SEQ ID NO:

54)



En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ip) (SEQ ID NO:

57)



En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente a un polímero de PEG.

En una modalidad específica, el polímero de PEG se une de una forma covalente al término N del análogo de péptido de conotoxina.

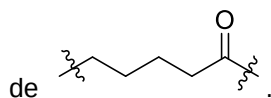
En una modalidad específica, el polímero de PEG se une de una forma covalente al término C del

análogo de péptido de conotoxina.

En una modalidad específica, el polímero de PEG se une de una forma covalente a una posición de residuo de aminoácido que no es el término N o el término C del análogo de péptido de conotoxina.

En una modalidad específica, el polímero de PEG se une de una forma covalente al análogo de péptido de conotoxina a través de un grupo de enlace.

En una modalidad específica, el grupo de enlace es un enlazador de valerato que tiene una fórmula



En una modalidad específica, el grupo de enlace es un butileno.

En una modalidad específica, el grupo de enlace es un carbonilo.

En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de PEG lineal o ramificado.

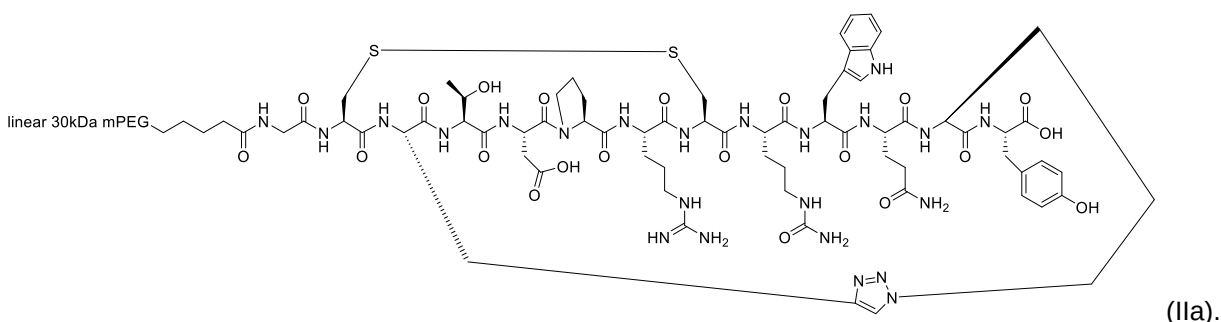
En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de PEG lineal.

En una modalidad específica, el polímero de PEG tiene un peso molecular en el intervalo de entre 10 kDa y 40 kDa.

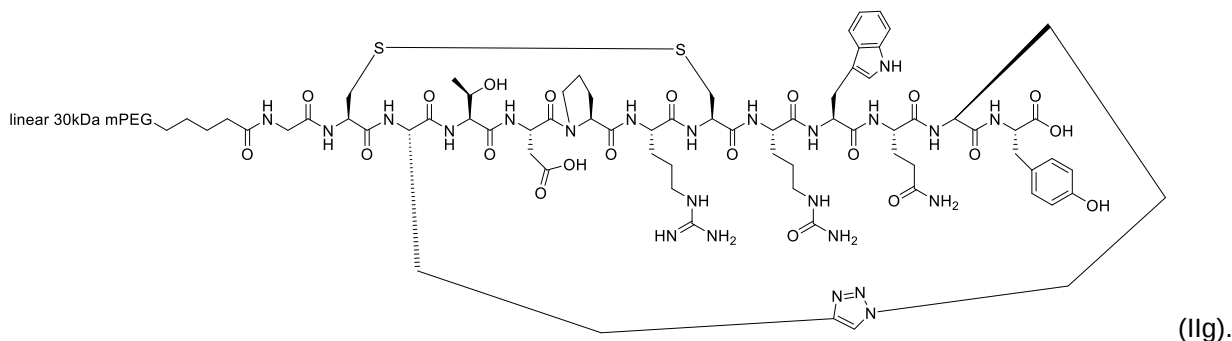
En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de PEG lineal de 30 kDa.

En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de mPEG lineal de 30 kDa.

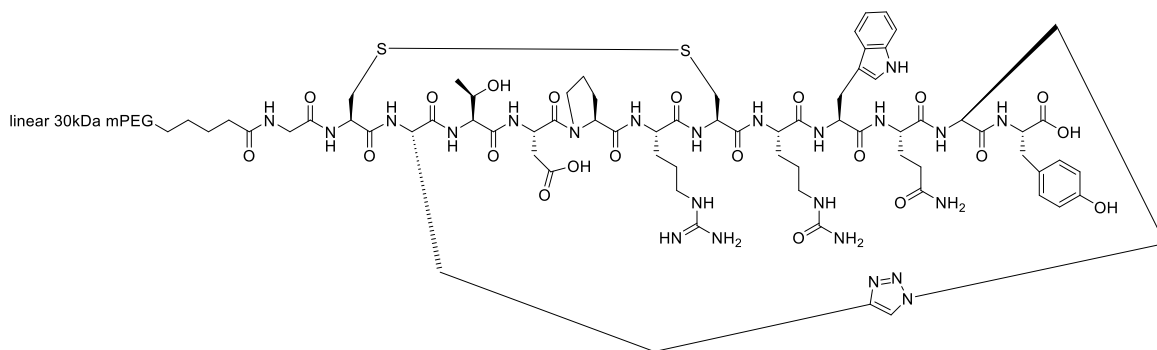
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIa) (SEQ ID NO: 83):



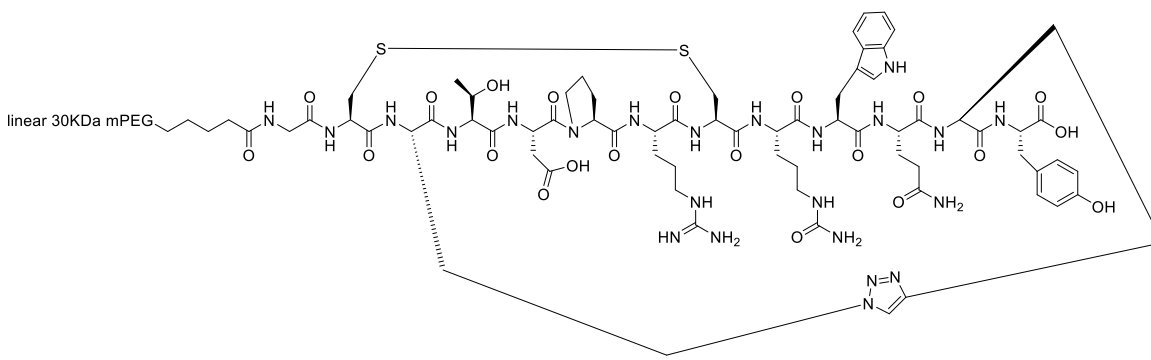
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIg) (SEQ ID NO: 95):



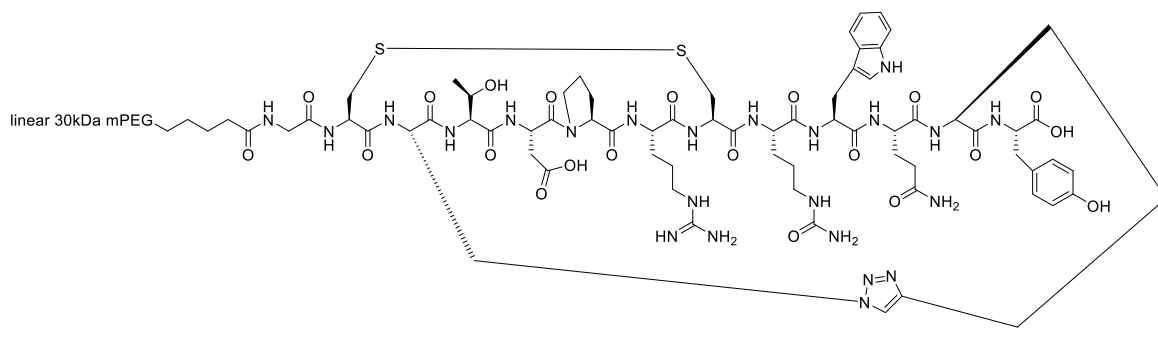
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIh) (SEQ ID NO: 96):



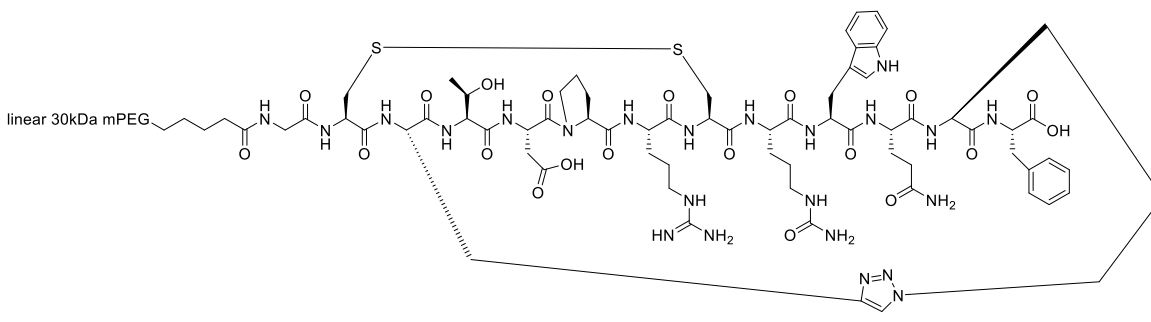
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIi)
(SEQ ID NO: 97):



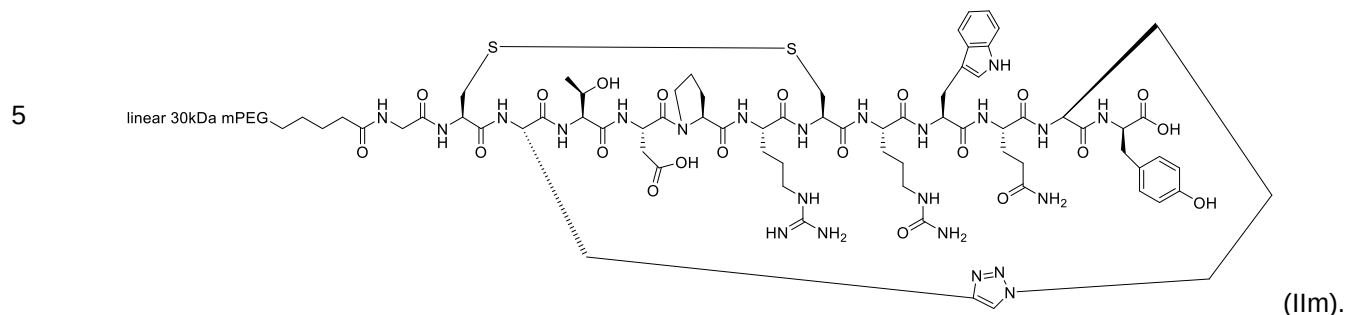
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIk)
(SEQ ID NO: 98):



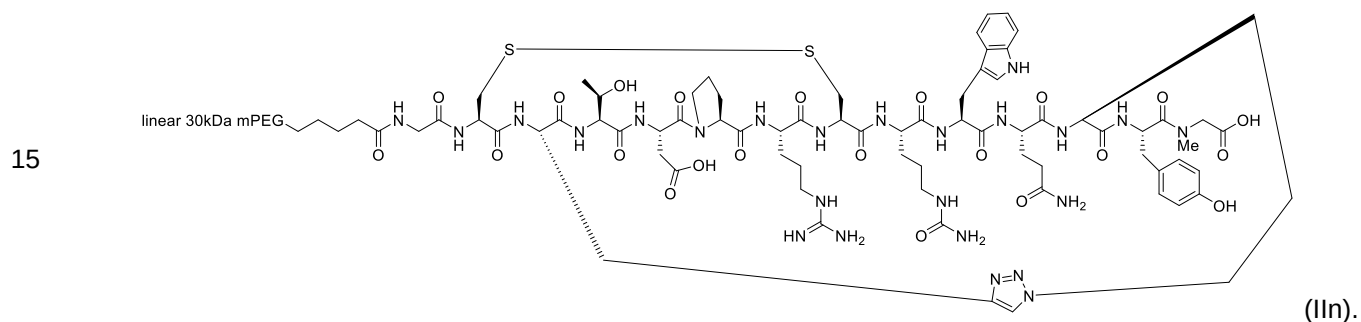
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (III)
(SEQ ID NO: 99):



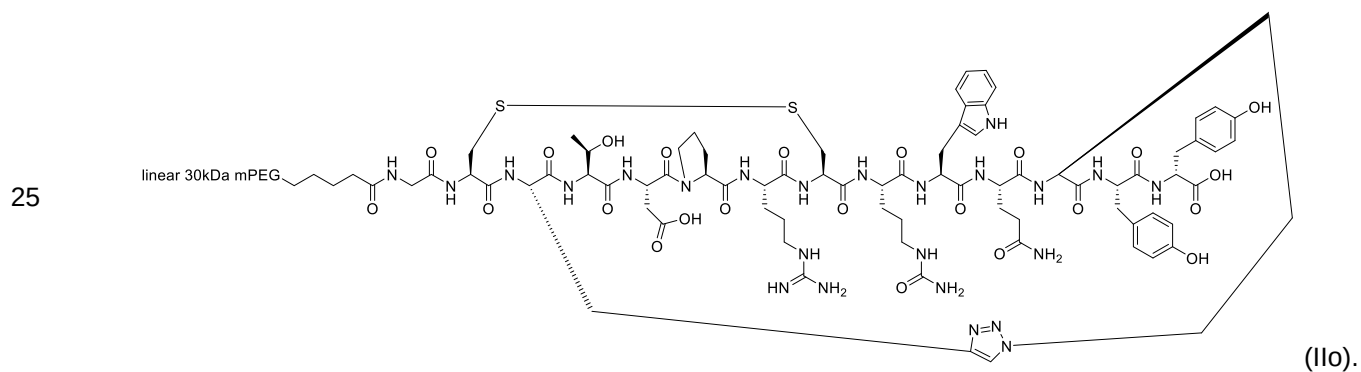
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIIm) (SEQ ID NO: 100):



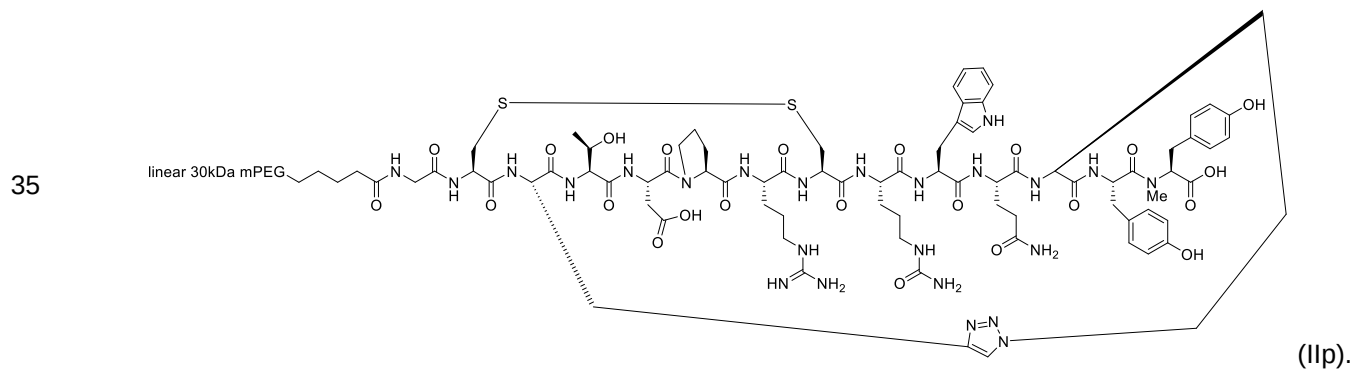
En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIIn) (SEQ ID NO: 101):

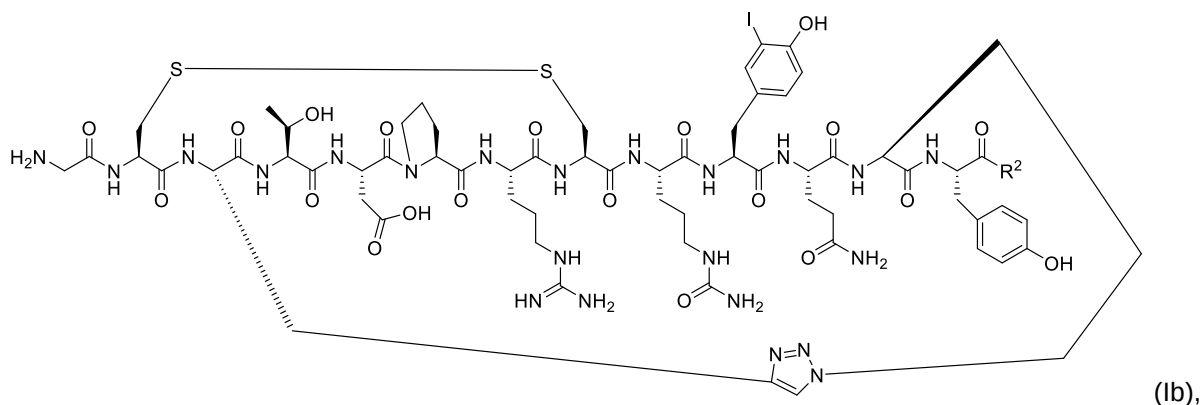


En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIo) (SEQ ID NO: 102):

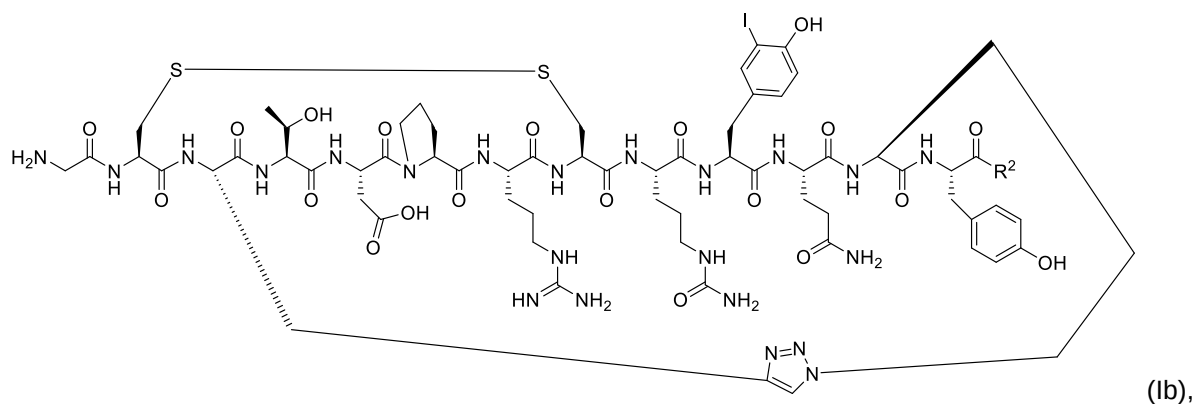


En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIp) (SEQ ID NO: 103):





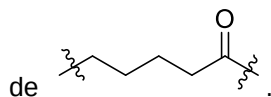
También se proporcionan en este documento los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ib) (SEQ ID NO: 104):



En una modalidad específica, el polímero de PEG se une de una forma covalente a una posición de residuo de aminoácido que no es el término N o el término C del análogo de péptido de conotoxina.

En una modalidad específica, el polímero de PEG se une de una forma covalente al análogo de péptido de conotoxina a través de un grupo de enlace.

5 En una modalidad específica, el grupo de enlace es un enlazador de valerato que tiene una fórmula



En una modalidad específica, el grupo de enlace es un butileno.

10 En una modalidad específica, el grupo de enlace es un carbonilo.

En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de PEG lineal o ramificado.

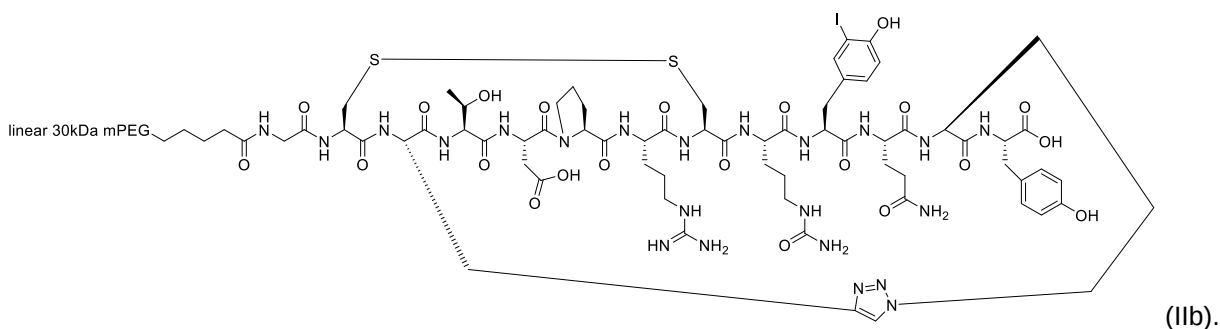
En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de PEG lineal.

En una modalidad específica, el polímero de PEG tiene un peso molecular en el intervalo de entre 10 kDa y 40 kDa.

15 En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de PEG lineal de 30 kDa.

En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de mPEG lineal de 30 kDa.

En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIb) (SEQ ID NO: 105):



También se proporcionan en este documento los análogos de péptidos de conotoxina seleccionados a partir del grupo que consiste en los análogos de péptidos de conotoxina **la, la', lb, lb', lc, ld, le, lf, lg, lh, li, lj, lk, ll, lm, ln, lo, lp, lq, lr, ls, lt, lu, y lv**, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

30 En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina se selecciona a partir del grupo que consiste en los análogos de péptidos de conotoxina **la, la', lb, lb', lg, lh, li, lk, ll, lm, ln, lo, y lp**.

En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina se selecciona a partir del grupo que consiste en los análogos de péptidos de conotoxina **la, la', lb, y lb'**.

35 También se proporcionan en este documento las composiciones farmacéuticas que comprenden un análogo de péptido de conotoxina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describen en este documento, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporcionan en este documento los métodos para tratar o prevenir una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que

contiene $\alpha 9$ (nAChR) en un sujeto, los cuales comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de péptido de conotoxina o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica que se describe en el presente documento.

5 También se proporcionan en este documento los métodos para el tratamiento o la prevención de una afección asociada con la activación de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR) en un sujeto, los cuales comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de péptido de conotoxina o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de la composición
10 farmacéutica que se describe en el presente documento.

En una modalidad específica, la afección que conduce al tratamiento o a la prevención por medio de la inhibición del nAChR que contiene $\alpha 9$ es el dolor o la inflamación.

En una modalidad específica, la afección es el dolor.

En una modalidad específica, el dolor se selecciona a partir del grupo que consiste en dolor general,
15 dolor crónico, dolor neuropático, dolor nociceptivo, dolor inflamatorio, dolor visceral, dolor somático, dolor inducido por daño en los nervios periféricos, dolor inducido por un trastorno inflamatorio, dolor inducido por un trastorno metabólico, dolor inducido por el cáncer, dolor inducido por la quimioterapia, dolor inducido por un procedimiento quirúrgico, y el dolor inducido por una quemadura.

En una modalidad específica, el dolor es el dolor crónico relacionado con el cáncer.

20 En una modalidad específica, la afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición del nAChR que contiene $\alpha 9$ es una afección inflamatoria.

En una modalidad específica, la afección inflamatoria se selecciona a partir del grupo que consiste en inflamación, inflamación crónica, una enfermedad reumática, sepsis, fibromialgia, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, endometriosis, fibromas uterinos, una enfermedad inflamatoria de la
25 piel, una afección inflamatoria de los pulmones, una enfermedad asociada con la inflamación del sistema nervioso, una enfermedad periodontal, y una enfermedad cardiovascular.

En una modalidad específica, la afección inflamatoria es mediada por las células inmunitarias.

En una modalidad específica, la afección inflamatoria es una inflamación de largo plazo y/o neuropatía periférica después de una lesión.

30 En una modalidad específica, la afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición del nAChR que contiene $\alpha 9$ es el dolor y la inflamación.

En una modalidad específica, la afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición del nAChR que contiene $\alpha 9$ es la inflamación y la neuropatía.

En una modalidad específica, la afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de
35 la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR) es una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR.

En una modalidad específica, el sujeto es un ser humano.

También se proporcionan en este documento los métodos para el tratamiento o la prevención del

dolor o de la inflamación en un sujeto, los cuales comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de péptido de conotoxina o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de la composición farmacéutica que se describe en el presente documento.

También se proporcionan en este documento los análogos de péptidos de conotoxina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento, para usarse en el tratamiento o en la prevención de una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR) en un sujeto.

También se proporcionan en este documento las composiciones farmacéuticas que comprenden un análogo de péptido de conotoxina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usarse en el tratamiento o en la prevención de una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR) en un sujeto.

También se proporcionan en este documento los usos de un análogo de péptido de conotoxina o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de la composición farmacéutica que se describe en el presente documento, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR) en un sujeto.

También se proporcionan en este documento los análogos de péptidos de conotoxina o una sal de los mismos, en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina es

Gly-Cys- X_{AA}^3 -Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 -Trp-Gln- X_{AA}^{12} -X (SEQ ID NO: 106),

en donde

X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-azidoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidohomoalanina, (S)-azidonorvalina y (S)-bishomopropargil glicina;

X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{12} se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidohomoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidonorvalina, y (S)-bishomopropargil glicina;

en donde cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-homopropargil glicina, y (S)-bishomopropargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidohomoalanina o (S)-azidonorvalina; y cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidoalanina, (S)-azidohomoalanina, y (S)-azidonorvalina, X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina o (S)-bishomopropargil glicina;

X es X_{AA}^1 o $X_{AA}^1 X_{AA}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-Me-Gly, D-Tyr o N-Me-Tyr; y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina o (S)-azidoalanina.

En una modalidad específica, X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina o (S)-bishomopropargil glicina.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina y X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-homopropargil glicina y X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina.

5 En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-homopropargil glicina y X_{AA}^{12} es (S)-azidohomoalanina.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-azidohomoalanina y X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-azidoalanina y X_{AA}^{12} es (S)-bishomopropargil glicina.

En una modalidad específica, X es X_{AA}^1 .

En una modalidad específica, X es $X_{AA}^1 X_{AA}^2$.

10 En una modalidad específica, X_{AA}^1 se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, D-Tyr y Phe.

En una modalidad específica, X es Tyr.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es OH.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es NH_2 .

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina, y X es Tyr.

15 En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo amida.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-homopropargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina, X es Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

20 En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-homopropargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidohomoalanina, X es Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-azidohomoalanina, X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina, X es Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

25 En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-azidoalanina, X_{AA}^{12} es (S)-bishomopropargil glicina, X es Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina, X es Phe; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina, X es D-Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

30 En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina, X es Tyr-N-Me-Gly; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina, X es Tyr-D-Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

35 En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina, X es Tyr-N-Me-Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

También se proporcionan en este documento los análogos de péptidos de conotoxina o una sal de los mismos, en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina es

Gly-Cys- X_{AA}^3 -Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 - X_{AA}^{10} -Gln- X_{AA}^{12} -Tyr (SEQ ID NO: 107),

en donde

X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina;

X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{10} es 3-yodo-Tyr;

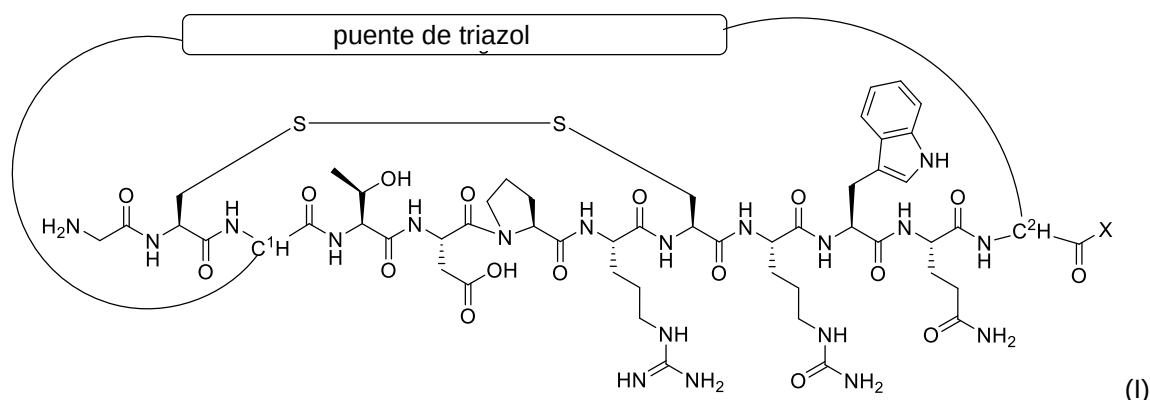
X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina;

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo amida.

También se proporcionan en este documento los métodos para hacer un análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I) (SEQ ID NO: 93) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en donde

X es X_{AA}^1 o $X_{AA}^1X_{AA}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-Me-Gly, D-Tyr, o N-Me-Tyr; y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I) es un ácido carboxílico o un grupo amida;

los cuales comprenden someter a un análogo de péptido de conotoxina intermediario o a una sal del mismo a condiciones de formación de triazol, en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina intermediario es Gly-Cys- X_{AA}^3 -Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 -Trp-Gln- X_{AA}^{12} -X (SEQ ID NO: 106),

en donde

X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-azidoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidohomoalanina, (S)-azidonorvalina y (S)-bishomopropargil glicina;

X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{12} se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidohomoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidonorvalina, y (S)-bishomopropargil glicina;

en donde, cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-homopropargil glicina, y (S)-bishomopropargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidohomoalanina o (S)-azidonorvalina; y cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidoalanina, (S)-azidohomoalanina, y

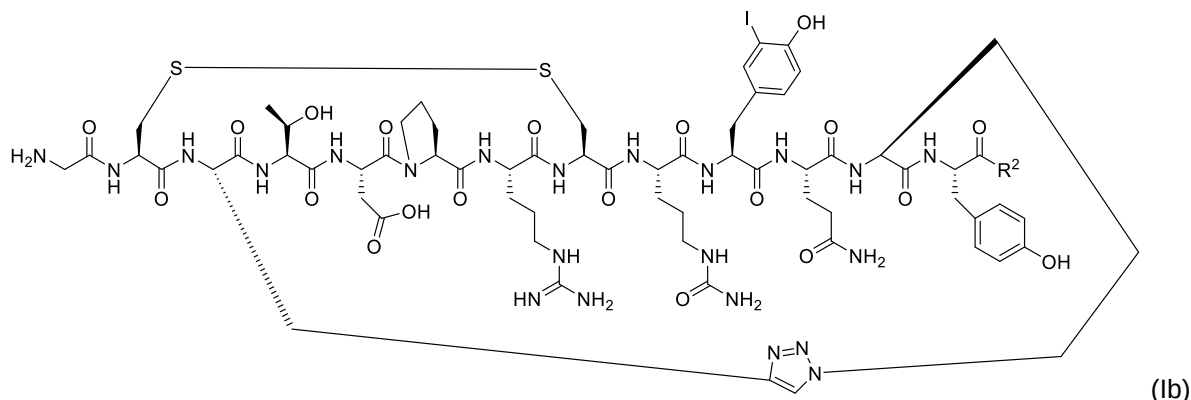
(S)-azidonorvalina, X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina o (S)-bishomopropargil glicina;

X es como se define anteriormente para el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I); y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina intermediario es como se define anteriormente para el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I); y

en donde, bajo dichas condiciones de formación de triazol X_{AA}^3 reacciona con X_{AA}^{12} para formar el puente de triazol en el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I).

También se proporcionan en este documento los métodos para hacer un análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (Ib) (SEQ ID NO: 104) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (Ib) es un ácido carboxílico o un grupo amida,

los cuales comprenden someter a un análogo de péptido de conotoxina intermediario o a una sal del mismo a condiciones de formación de triazol, en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina intermediario es Gly-Cys-X_{AA}³-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-X_{AA}⁹-X_{AA}¹⁰-Gln-X_{AA}¹²-Tyr (SEQ ID NO: 107),

en donde

X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina;

X_{AA}^9 es citrulina:

X_{AA}^{10} es 3-yodo-Tyr;

X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina; y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina intermediario es como se define anteriormente para el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (Ib); y

en donde, bajo dichas condiciones de formación de triazol, X_{AA}^3 reacciona con X_{AA}^{12} para formar un puente de triazol como se representa en el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (Ib).

También se proporcionan en este documento los métodos para la elaboración de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, los cuales comprenden poner en contacto en condiciones de reacción un análogo de péptido de conotoxina o una sal del mismo, con uno o más polímeros reactivos de polietilen glicol (PEG) para formar un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, en donde los polímeros de PEG reactivos comprenden cada uno un grupo reactivo enlazado de una forma covalente, opcionalmente a través de un grupo de enlace, a un polímero de PEG,

y en donde cada grupo reactivo reacciona bajo las condiciones de reacción para formar un enlace covalente con el análogo de péptido de conotoxina por medio de lo cual el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente directamente o por medio de un grupo de enlace a los uno o más polímeros de PEG,

5 en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina es Gly-Cys- X_{AA}^3 -Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 -Trp-Gln- X_{AA}^{12} -X (SEQ ID NO: 106),

en donde

X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-azidoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidohomoalanina, (S)-azidonorvalina y (S)-bishomopropargil glicina;

10 X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{12} se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidohomoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidonorvalina, y (S)-bishomopropargil glicina;

en donde, cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-homopropargil glicina, y (S)-bishomopropargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidohomoalanina o (S)-azidonorvalina; y cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidoalanina, (S)-azidohomoalanina, y (S)-azidonorvalina, X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina o (S)-bishomopropargil glicina;

15 X es X_{AA}^1 o $X_{AA}^1X_{AA}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-Me-Gly, D-Tyr o N-Me-Tyr; y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida.

20 También se proporcionan en este documento los métodos para la elaboración de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, los cuales comprenden poner en contacto en condiciones de reacción un análogo de péptido de conotoxina o una sal del mismo, con uno o más polímeros reactivos de polietilen glicol (PEG) para formar un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, en donde los polímeros de PEG reactivos comprenden cada uno un grupo reactivo enlazado de una forma covalente, opcionalmente a través de un grupo de enlace, a un polímero de PEG, y en donde cada grupo reactivo reacciona bajo las condiciones de reacción para formar un enlace covalente con el análogo de péptido de conotoxina por medio de lo cual el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente directamente o por medio de un grupo de enlace a los uno o más polímeros de PEG,

30 en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina es Gly-Cys- X_{AA}^3 -Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 - X_{AA}^{10} -Gln- X_{AA}^{12} -Tyr (SEQ ID NO: 107),

en donde

X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina;

35 X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{10} es 3-yodo-Tyr;

X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina;

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo

amida.

4. Breve Descripción de las Figuras

Figura 1A a figura 1D: Mezcla en disulfuro de CSP-4-NH₂ en suero humano. Figura 1 A: Se añadió CSP-4-NH₂ al suero humano y se incubó a 37 °C durante el período especificado, después de lo cual las muestras se congelaron, se purificaron por medio de una precipitación y filtración, y se analizaron por medio de una RP-HPLC. Se observó una conversión dependiente del tiempo del pico principal al pico secundario con un tiempo de retención más rápido. Figura 1 B: Se analizaron las inyecciones individuales de los isómeros de cinta, esfera y nativos de CSP-4-NH₂ sintéticamente contruidos, junto con una muestra de CSP-4-NH₂ aislado a partir del suero humano. La comigración de los picos derivados del suero indicó la conversión de la forma nativa hasta el isómero de cinta. Figura 1C: El aislamiento del compuesto de CSP-4-NH₂ derivado del suero, seguido de liofilización, y el análisis de espectrometría de masas indicaron que tanto el isómero nativo como el isómero de cinta tienen la misma proporción de la masa a la carga. Figura 1D: La conversión de la forma globular hasta la forma de cinta por medio de la reducción con glutathione del CSP-4-NH₂ indicó que la mezcla en disulfuro subyace a la isomerización.

Figura 2A y figura 2B: Análisis de HPLC en fase inversa del análogo de péptido de conotoxina Ia y el análogo de péptido de conotoxina CSP-4-NH₂ en el plasma de la rata. Figura 2A: Análisis de HPLC en fase inversa del análogo de péptido de conotoxina Ia a las 0 h, 8 h y 24 h (línea de color negro: 0 h; línea de color gris oscuro: 8 h; línea de color gris claro: 24 h). Figura 2B: Análisis de HPLC en fase inversa del análogo de péptido de conotoxina CSP-4-NH₂ (la forma "nativa", la cual consiste en dos enlaces de disulfuro, uno entre Cys2 y Cys8, y un segundo enlace entre Cys3 y Cys12) en el plasma de la rata a las 0 h, 8 h y 24 h (línea de color negro: 0 h; línea de color gris oscuro: 8 h; línea de color gris claro: 24 h).

Figura 3A y figura 3B: Las curvas de concentración - respuesta de los análogos de péptidos de conotoxina para la inhibición de las corrientes activadas por ACh en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. Figura 3 A: Las curvas de concentración - respuesta de los análogos de péptidos de conotoxina Ia, Ia' y Ib' para la inhibición de las corrientes activadas por ACh en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano (●: Ia; ▲: Ia'; □: Ib'). Figura 3 B: Las curvas de concentración - respuesta de los análogos de péptidos de conotoxina CSP-4-NH₂ y CSP-4-OH para la inhibición de las corrientes activadas por ACh en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano (●: CSP-4-NH₂; ▲: CSP-4-OH).

Figura 4: La comparación de las secuencias de aminoácidos de RgIA (SEQ ID NO: 1), ImI (SEQ ID NO: 2) y Vc1.1 (SEQ ID NO: 3).

Figura 5A y figura 5B: Las curvas de concentración - respuesta de los análogos de péptidos de conotoxina para la inhibición de las corrientes activadas por ACh en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. Figura 5 A: Las curvas de concentración - respuesta de los análogos de péptidos de conotoxina CSP-4-OH y CSP-4-desTyr-OH para la inhibición de las corrientes activadas por ACh en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano (▲: CSP-4-OH; ■: CSP-4-desTyr-OH). Figura 5B: Las curvas de concentración - respuesta de los análogos de péptidos de conotoxina 1a y 1q para la inhibición de las corrientes activadas por ACh en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano (●: 1a; ■: 1q).

Figura 6A y figura 6B: Trazas representativas de un ovocito inyectado bien con el nAChR $\alpha 9\alpha 10$

humano (a la izquierda) o de rata (a la derecha). Corrientes activadas por ACh antes y después de la exposición al compuesto del análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa. Figura 6 A: Respuesta a ACh del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. Figura 6 B: Respuesta a ACh del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de la rata.

Figuras 7A y 7B: Perfil farmacocinético de los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados en las ratas. Perfiles de la concentración promedio contra el tiempo del análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa y del análogo de péptido de conotoxina la administrados por la vía intravenosa y por la vía subcutánea a las ratas en 1 mg por kg ($n = 3$). Figura 7A: Perfil farmacocinético del análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa ( : Administración IV en 1 mg por kg;  : Administración SC en 1 mg por kg). Figura 7B: Perfil farmacocinético del análogo de péptido de conotoxina la ( : Administración IV en 1 mg por kg;  : Administración SC en 1 mg por kg).

Figura 8: Perfil farmacocinético del análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa en los monos. Perfil de la concentración promedio contra el tiempo del compuesto 21 administrado por la vía intravenosa y por la vía subcutánea a los monos macacos cinomolgos en 1 mg por kg ($n = 3$) ( : Administración IV en 1 mg por kg;  : Administración SC en 1 mg por kg).

Figura 9: Eficacia analgésica y duración del efecto del análogo de péptido de conotoxina Ib' en un modelo de lesión por constricción crónica (CCI) de la rata (■: 0.1 mg por kg al día del análogo de péptido de conotoxina Ib'; ●: vehículo).

Figura 10A a figura 10C: La eficacia analgésica y la duración del efecto del análogo de péptido de conotoxina CSP-4-NH₂ y los derivados PEGilados de CSP-4-NH₂ en el modelo de CIPN de la rata. Figura 10A: La hiperalgesia mecánica se midió por medio de la prueba de Randall-Selitto, que demostró la eficacia analgésica (respuesta normalizada) del CSP-4-NH₂ y de los péptidos de conotoxina PEGilados VIII y X en el modelo de CIPN de la rata más de 96 h después de la dosis. Figura 10 B: La hiperalgesia mecánica se midió por medio de la prueba de Randall-Selitto, que demostró la eficacia analgésica (respuesta normalizada) del CSP-4-NH₂ y de los péptidos de conotoxina PEGilados VII, IX, XI y XII en el modelo de CIPN de la rata más de 96 h después de la dosis. Figura 10C: La gráfica de compendio de duración de la eficacia del CSP-4-NH₂ y de los derivados PEGilados del CSP-4-NH₂ mostró que la duración de la eficacia se correlaciona tanto con la química de conjugación de PEGilación (ramificación vs lineal) como con el tamaño del polímero de PEG conjugado.

Figura 11A a figura 11C: Eficacia analgésica y duración del efecto de los análogos de péptidos de conotoxina Ia', Ia, y del análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa en un modelo de neuropatía periférica inducida por la quimioterapia (CIPN) en la rata. Figura 11A: La administración de una sola dosis de 0.5 mg por kg del análogo de péptido de conotoxina Ia' a las ratas que tenían neuropatía periférica inducida por oxaliplatino, 14 días después de la inducción de la neuropatía, dio como resultado una reducción estadísticamente significativa de la hiperalgesia mecánica en comparación con los animales de control tratados con vehículo por un máximo de 24 h. (■: 0.5 mg por kg del análogo de péptido de conotoxina Ia'; ●: vehículo). Figura 11B: La administración de una sola dosis de 0.5 mg por kg del Ia' a las ratas con lesión del nervio intacto en el día 14 después de la inducción quirúrgica del modelo dio como resultado una

reducción estadísticamente significativa en la hiperalgesia mecánica en comparación con los animales de control tratados con vehículo por un máximo de 24 h (■: 0.5 mg por kg del análogo de péptido de conotoxina Ia'; ●: vehículo). Figura 11C: La administración de una sola dosis de 0.5 mg por kg del análogo de péptido de conotoxina Ia o del análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa a las ratas con neuropatía periférica inducida por oxaliplatino, 14 días después de la inducción de la neuropatía, dio como resultado una reducción significativa de la hiperalgesia mecánica en comparación con los animales de control tratados con vehículo por un máximo de 4 h (análogo de péptido de conotoxina Ia) o de 72 h (análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa) después de la dosis (◊ : vehículo; ◆ : análogo de péptido de conotoxina Ia; ■ : análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa). La hiperalgesia mecánica se midió por medio del umbral de retiro de la pata de Randall Selitto en gramos. El criterio de valoración para todos los estudios fue el umbral de retiro de la pata de Randall Selitto en gramos. ANOVA de dos vías, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

5. Descripción Detallada de la Invención

Se debe entender que la divulgación no se limita a las modalidades particulares que se estipulan en el presente documento, y también se debe entender que la terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente las modalidades particulares, y no pretende ser limitante.

En el presente documento se proporcionan análogos de péptidos de alfa-conotoxina, los cuales incluyen a los análogos de péptidos de alfa-conotoxina que se unen de una forma covalente al polietilen glicol (PEG), y composiciones farmacéuticas de tales análogos de péptidos de alfa-conotoxina. También se proporcionan en este documento los métodos para tratar o prevenir una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) que contiene $\alpha 9$ (por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ del nAChR) en un sujeto.

5.1. Abreviaturas utilizadas en este documento

Abreviatura	Significado
AcOH	Ácido acético
(Boc) ₂ O	Dicarbonato de di-ter-butilo
<i>t</i> Bu	<i>ter</i> -Butilo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CuSO ₄	Sulfato de cobre (II)
DBU	1, 8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

	DIPEA	N, N-diisopropiletilamina
	DMF	Dimetil formamida
5	DMSO	Sulfóxido de dimetilo
	EDT	1,2-etanoditiol
	Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonilo
10	Et ₂ O	Dietil éter
	HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
	h	Hora(s)
15	iPrOH	Iso-propanol
	HATU	Hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1, 2, 3-triazolo[4, 5-b]piridinio
20	min	Minuto(s)
	MeOH	Metanol
	PBS	Solución salina regulada con fosfato
25	Pbf	2, 2, 4, 6, 7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
	PEG	Polietilen glicol
	PPTS	p-Toluensulfonato de piridinio
30	RT	Tiempo de retención
	TBTU	Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N, N, N', N'-tetrametiluronio
35	TEA	Trietilamina
	TFA	Ácido trifluoroacético
	Trt	Trifenilmetilo

Se apreciará que a través de toda esta divulgación se hace referencia a los aminoácidos de acuerdo con los códigos de una sola letra o de tres letras. Los aminoácidos que forman la totalidad o una parte de un péptido pueden ser de entre los 21 aminoácidos de origen natural conocidos, los cuales se denominan tanto por sus abreviaturas de una sola letra como por sus abreviaturas de tres letras comunes. En las secuencias de péptidos que se proporcionan en este documento, los residuos de aminoácidos convencionales tienen su significado convencional. Por lo tanto, “Leu” es leucina, “Ile” es isoleucina, “Nle” es norleucina, y así sucesivamente. Con el fin de ayudar al lector, los aminoácidos convencionales y sus abreviaturas correspondientes de tres letras y de una sola letra son como sigue:

alanina	Ala	(A)
arginina	Arg	(R)
asparagina	Asn	(N)
ácido aspártico	Asp	(D)
cisteína	Cys	(C)
ácido glutámico	Glu	(E)
glutamina	Gln	(Q)
glicina	Gly	(G)
histidina	His	(H)
isoleucina	Ile	(I)
leucina	Leu	(L)
lisina	Lys	(K)
metionina	Met	(M)
fenilalanina	Phe	(F)
prolina	Pro	(P)
serina	Ser	(S)

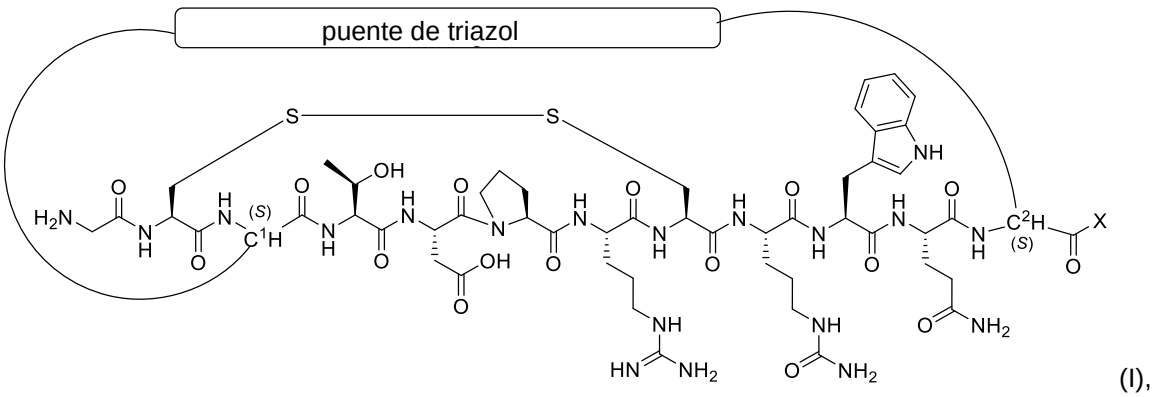
treonina	Thr	(T)
triptófano	Trp	(W)
tirosina	Tyr	(Y)
valina	Val	(V)

En las secuencias de péptidos que se proporcionan en este documento, otros aminoácidos y sus correspondientes abreviaturas de tres letras son como sigue:

(S)-5-azidonorvalina	5-azidoNVa
(S)-propargil glicina	Pra
(S)-3-azido-alanina	3-azidoAla
(S)-homopropargil glicina	homoPra
(S)-γ-azido-homoalanina	azidohomoAla
(S)-bis-homopropargil glicina	bishomoPra
Citrulina	Cit

5.2. Análogos de péptidos de conotoxina RgIA

En un aspecto, en el presente documento se proporcionan los análogos de péptidos de conotoxina de la fórmula (I) (SEQ ID NO: 93):



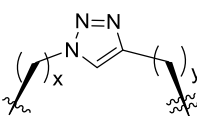
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos,
en donde

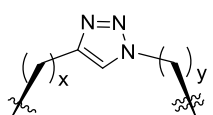
X es X_{AA}^1 o $X_{AA}^1X_{AA}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-

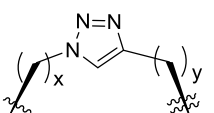
Me-Gly, D-Tyr o N-Me-Tyr;

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida.

Las anotaciones de "(S)" cerca del carbono C¹ y C² en la fórmula (I) indican la configuración absoluta del carbono C¹ y C².

En diversas modalidades, el puente de triazol es  o , en donde la línea ondulada individual (~~~~) indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles (~~~~) indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina; y en donde x es 1, 2, 3 o 4; y

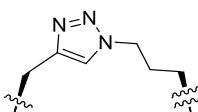
es 2, 3 o 4. En una modalidad específica, el puente de triazol es . En una modalidad

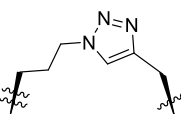
específica, el puente de triazol es .

En una modalidad específica, x es 1, 2, 3 o 4. En una modalidad preferida, x es 1, 2 o 3. En una modalidad específica, x es 1 o 2. En una modalidad, x es 1. En otra modalidad, x es 2.

En una modalidad específica, y es 2, 3 o 4. En una modalidad específica, y es 2 o 3. En una modalidad, y es 3. En otra modalidad, y es 2.

En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3, e y es 2. En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3, e y es 3. En una modalidad específica, x es 1 o 2, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 1 o 3, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 2 o 3, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 1, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 2, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 3, e y es 2 o 3. En una modalidad preferida, x es 1, e y es 3. En una modalidad preferida, x es 2, e y es 3. En una modalidad preferida, x es 2, e y es 2.

En una modalidad específica, el puente de triazol es , en donde la línea ondulada individual (~~~~) indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles (~~~~) indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina.

En una modalidad específica, el puente de triazol es , en donde la línea ondulada

individual () indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles () indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina.

5

En una modalidad específica, X es X_{AA}¹. En una modalidad específica, X es X_{AA}¹ X_{AA}².

En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr, Phe o Trp. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr, D-Tyr o Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr o D-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr o Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es D-Tyr o Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es D-Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Trp. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es D-Trp. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es D-Tyr. En una modalidad preferida, X_{AA}¹ es Tyr.

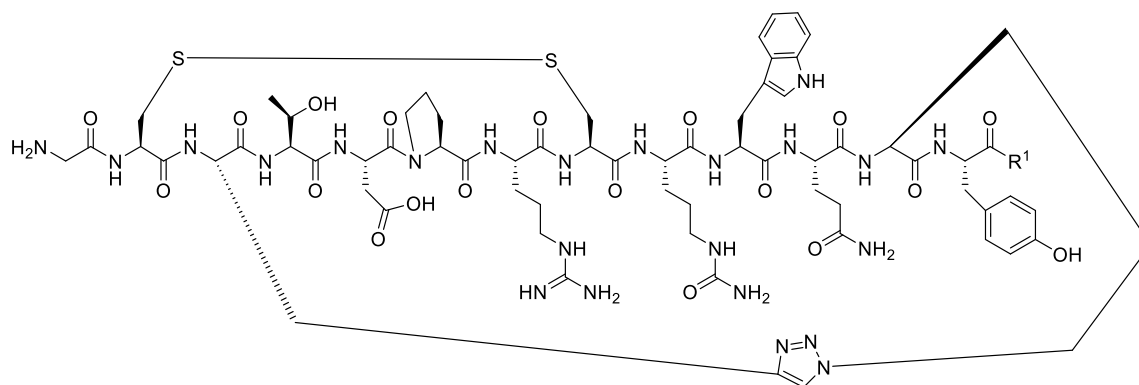
En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Gly, D-Tyr, o N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Gly o D-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es D-Tyr o N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Gly o N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Gly. En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es D-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² está opcionalmente presente. En una modalidad específica, X_{AA}² está presente. En una modalidad específica, X_{AA}² está ausente.

En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, Phe, D-Tyr, (Tyr)-(D-Tyr), (Tyr)-(N-Me-Gly), (Tyr)-(N-Me-Tyr), N-Me-Tyr, D-Arg, N-Me-D-Tyr, beta-Tyr, y N-Me-Arg. En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, Phe, D-Tyr, (Tyr)-(D-Tyr), (Tyr)-(N-Me-Gly), y (Tyr)-(N-Me-Tyr). En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, Phe, y D-Tyr. En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en (Tyr)-(D-Tyr), (Tyr)-(N-Me-Gly), y (Tyr)-(N-Me-Tyr). En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en N-Me-Tyr, D-Arg, N-Me-D-Tyr, beta-Tyr, y N-Me-Arg. En una modalidad específica, X es Tyr. En una modalidad específica, X es Phe. En una modalidad específica, X es D-Tyr. En una modalidad específica, X es (Tyr) - (D-Tyr). En una modalidad específica, X es (Tyr) - (N-Me-Gly). En una modalidad específica, X es (Tyr) - (N-Me-Tyr). En una modalidad específica, X es N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X es D-Arg. En una modalidad específica, X es N-Me-D-Tyr. En una modalidad específica, X es beta-Tyr. En una modalidad específica, X es N-Me-Arg.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida. En una modalidad preferida, el término C del análogo de péptido de conotoxina es OH. En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es NH₂.

35

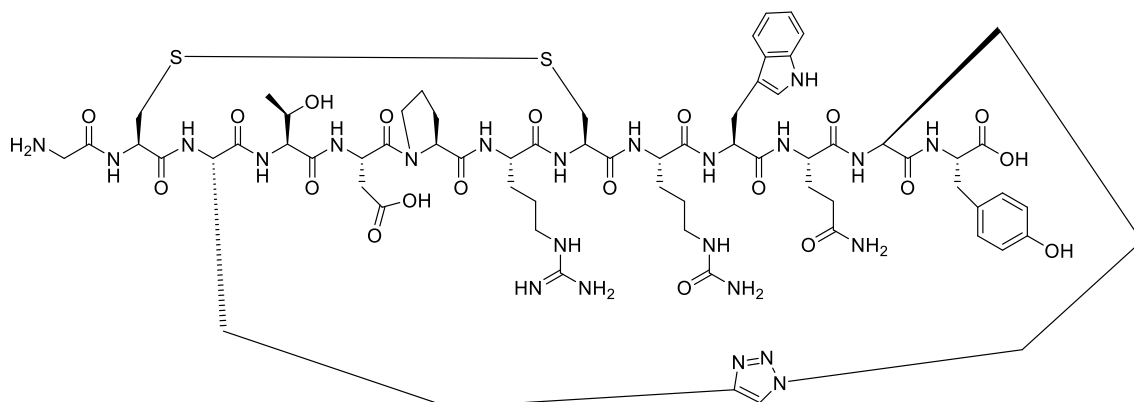
En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ia) (SEQ ID NO: 94):



(Ia),

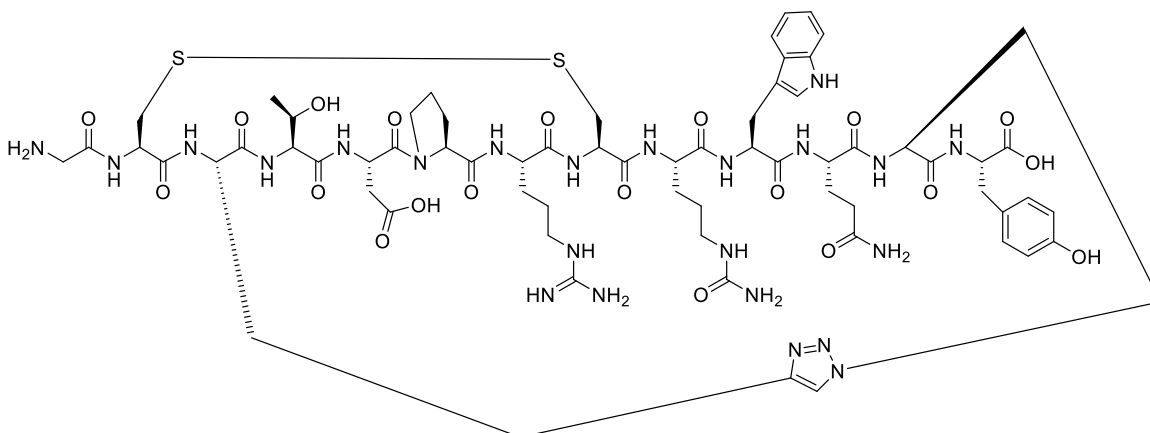
en donde R^1 es OH o NH_2 . En una modalidad específica, R^1 es OH. En una modalidad específica, R^1 es NH_2 .

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ig) (SEQ ID NO: 30):



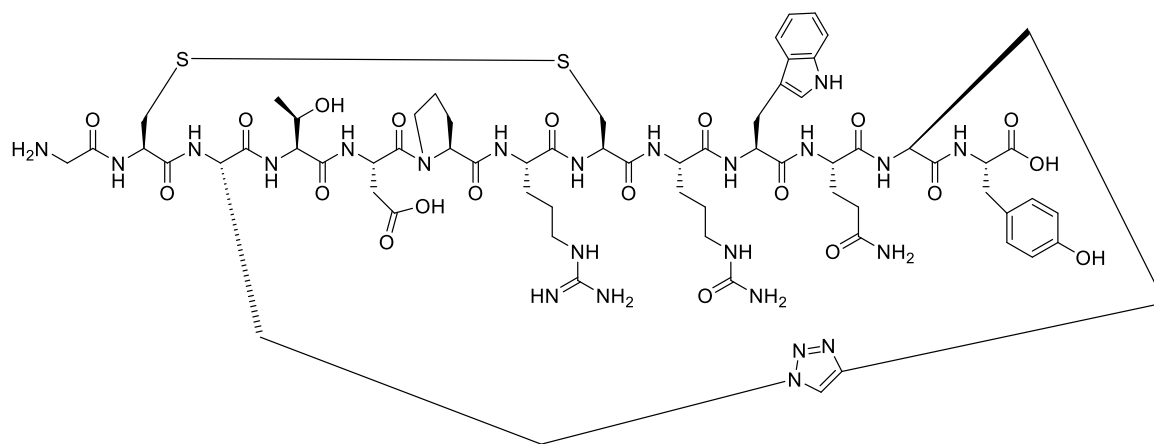
(Ig).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ih) (SEQ ID NO: 33):



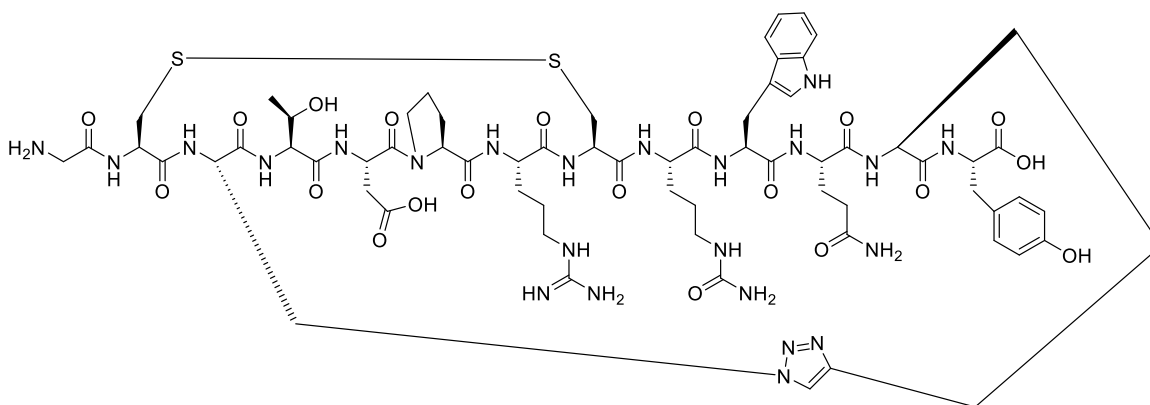
(Ih).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ii) (SEQ ID NO: 36):



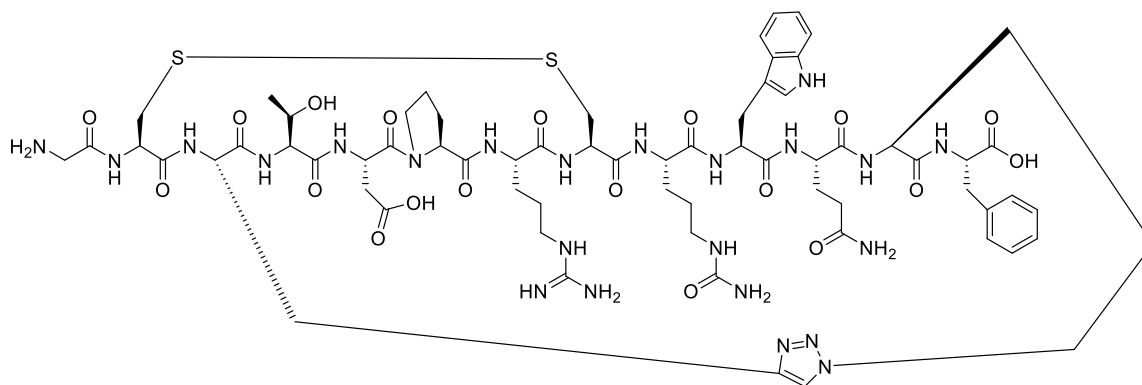
(Ii).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ik) (SEQ ID NO: 42):



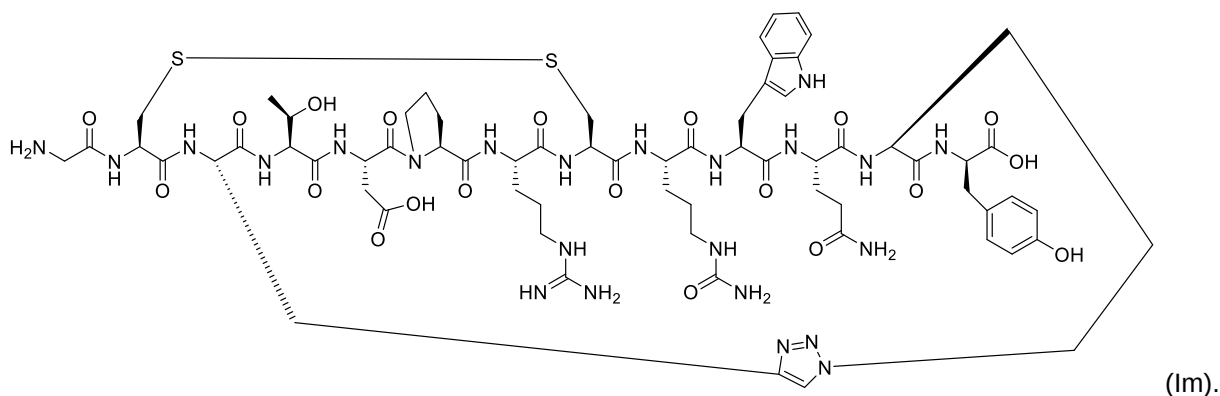
(Ik).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (II) (SEQ ID NO: 45):

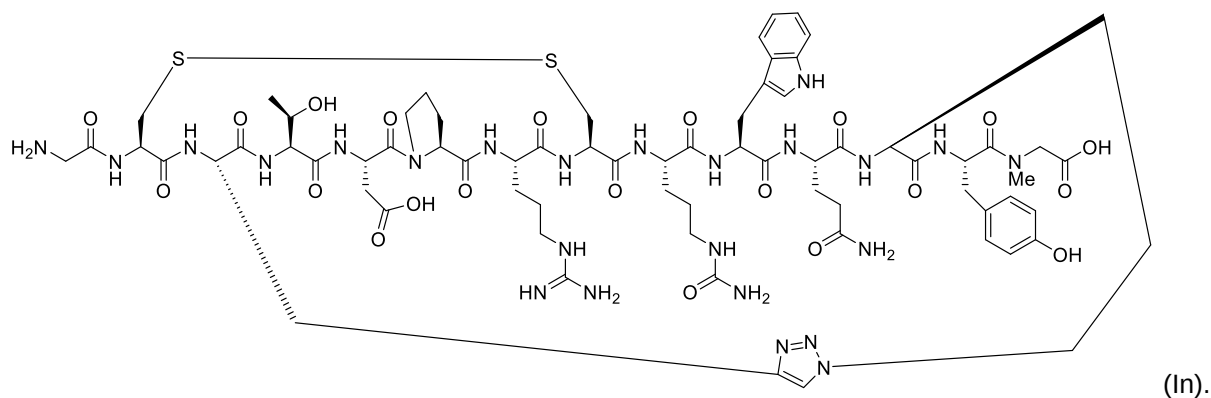


(II).

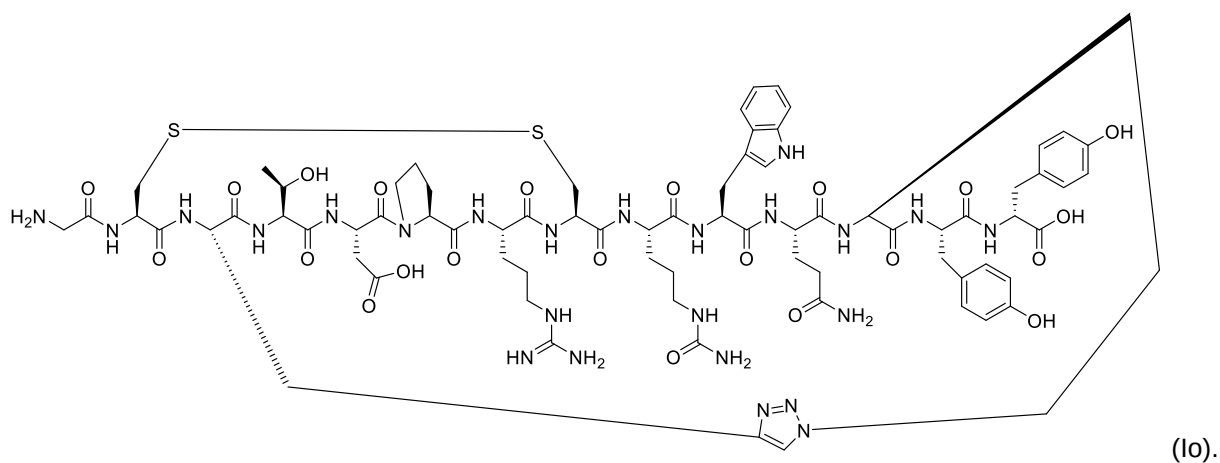
En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Im) (SEQ ID NO: 48):



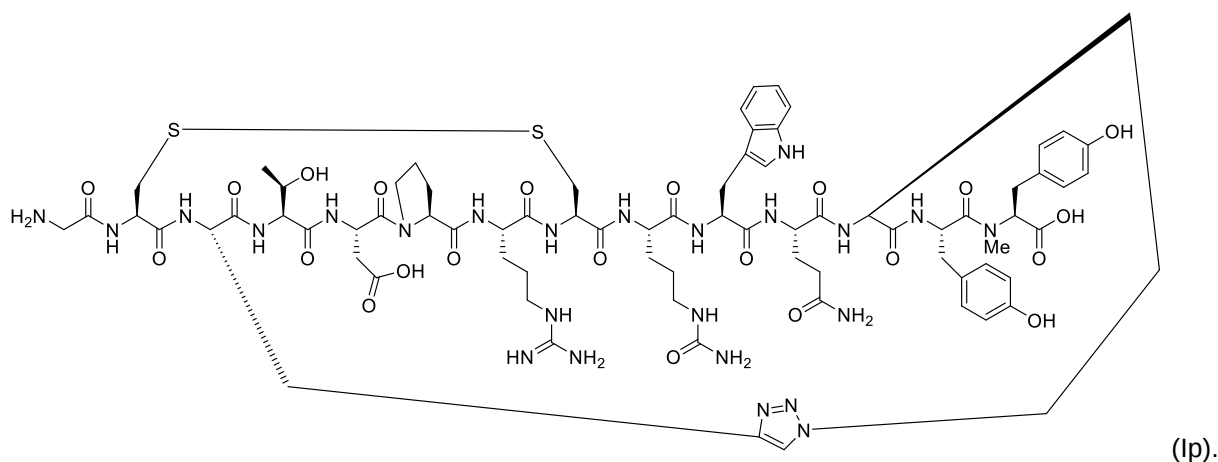
10 En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (In) (SEQ ID NO: 51):



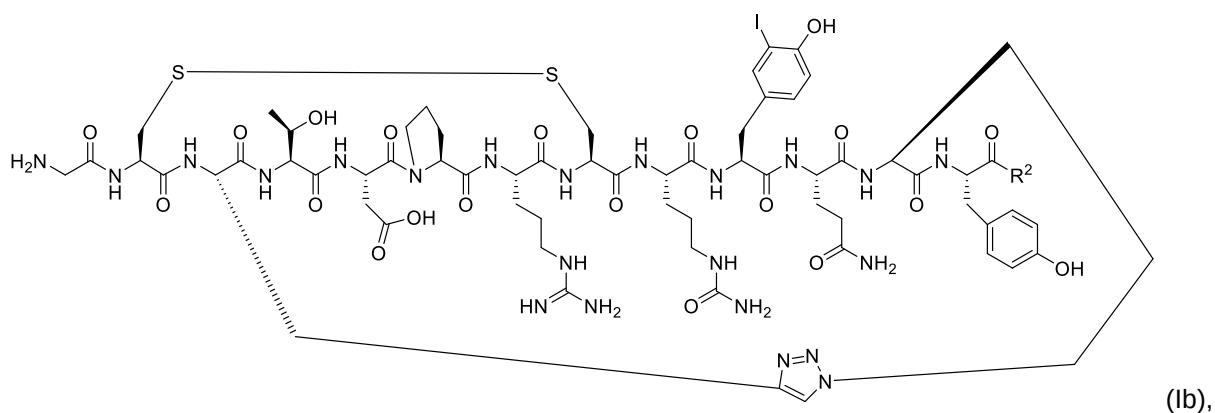
25 En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Io) (SEQ ID NO: 54):



35 En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ip) (SEQ ID NO: 57):



En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan los análogos de péptidos de conotoxina de la fórmula (Ib) (SEQ ID NO: 104):



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos,
 en donde R^2 es OH o NH_2 .

En una modalidad específica, R^2 es OH. En una modalidad específica, R^2 es NH_2 .

En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan los análogos de péptidos de conotoxina seleccionados a partir del grupo que consiste en los análogos de péptidos de conotoxina **la**, **la'**, **lb**, **lb'**, **lc**, **ld**, **le**, **lf**, **lg**, **lh**, **li**, **lj**, **lk**, **ll**, **lm**, **ln**, **lo**, **lp**, **lq**, **lr**, **ls**, **lt**, **lu**, y **lv**, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina se selecciona a partir del grupo que consiste en los análogos de péptidos de conotoxina **la**, **la'**, **lb**, **lb'**, **lg**, **lh**, **li**, **lk**, **ll**, **lm**, **ln**, **lo**, y **lp**.

En una modalidad específica, el análogo de péptido de conotoxina se selecciona a partir del grupo que consiste en los análogos de péptidos de conotoxina **la**, **la'**, **lb**, y **lb'**. En una modalidad preferida, el análogo de péptido de conotoxina es el análogo de péptido de conotoxina **la** o **la'**. En una modalidad preferida, el análogo de péptido de conotoxina es el análogo de péptido de conotoxina **la**.

5.3. Análogos de péptidos de conotoxina RgIA PEGilados

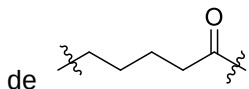
En una modalidad, los análogos de péptidos de conotoxina de la invención son PEGilados, en particular, se unen de una forma covalente a uno o más polímeros de PEG.

En una modalidad específica, un análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente a un polímero de PEG. En una modalidad específica, un análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente a más de un polímero de PEG. En una modalidad específica, un análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente a dos polímeros de PEG. En una modalidad específica, un análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente a tres polímeros de PEG.

En una modalidad preferida, un polímero de PEG se une de una forma covalente al término N de un análogo de péptido de conotoxina, más preferiblemente un polímero de PEG se une sólo al término N. En una modalidad específica, un polímero de PEG se une de una forma covalente al término C de un análogo de péptido de conotoxina. En una modalidad específica, un polímero de PEG se une de una forma covalente a una posición de residuo de aminoácido que no es el término N o el término C del análogo de péptido de conotoxina.

En una modalidad específica, un polímero de PEG se une de una forma covalente al análogo de péptido de conotoxina a través de un grupo de enlace. En una modalidad específica, un polímero de PEG se une de una forma covalente al análogo de péptido de conotoxina directamente.

En una modalidad preferida, el grupo de enlace es un enlazador de valerato que tiene una fórmula

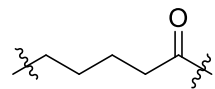


. En una modalidad específica, el grupo de enlace es un butileno. En una modalidad específica, el grupo de enlace es un butileno. En una modalidad específica, el grupo de enlace es un carbonilo.

En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de PEG lineal o ramificado. En una modalidad específica, el polímero de PEG es un polímero de PEG ramificado. En una modalidad preferida, el polímero de PEG es un polímero de PEG lineal.

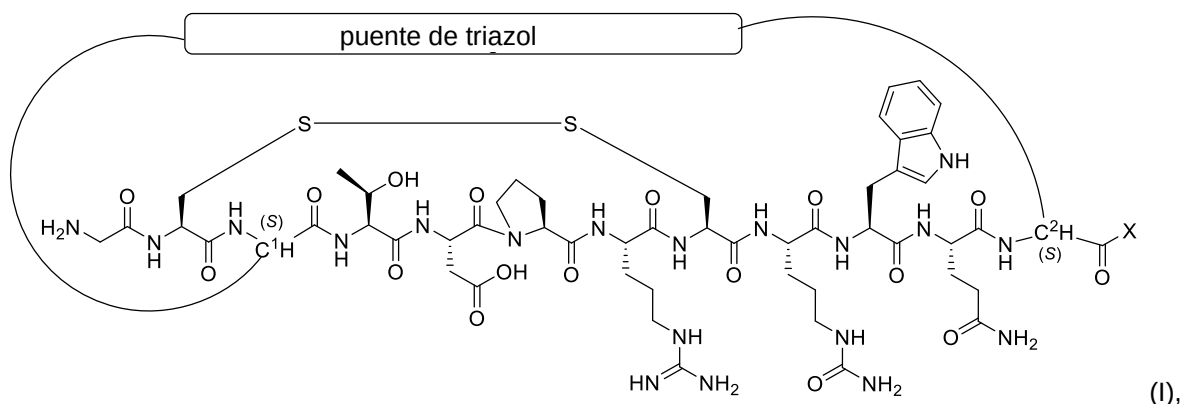
En una modalidad específica, el polímero de PEG tiene un peso molecular en el intervalo de entre 10 kDa y 40 kDa. En una modalidad preferida, el polímero de PEG es un polímero de PEG de 30 kDa. En las modalidades específicas, el polímero de PEG es un polímero de PEG lineal de 30 kDa. En las modalidades específicas, el polímero de PEG es un polímero de mPEG lineal de 30 kDa.

En una modalidad preferida, un polímero de PEG se une en el término amino de un análogo de péptido de conotoxina, y el polímero de PEG se une a través de un grupo de enlace al análogo de péptido de conotoxina, y el grupo de enlace es un enlazador de valerato que tiene una fórmula de



, y el polímero de PEG es un polímero de mPEG lineal de 30 kDa.

En una modalidad específica, en el presente documento se proporciona un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (I) (SEQ ID NO: 93):

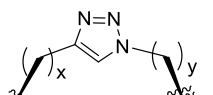
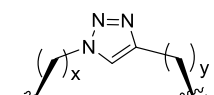


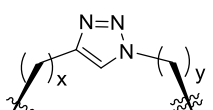
en donde

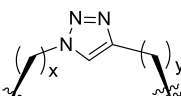
X es X_{AA}^1 o $X_{AA}^1 X_{AA}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-Me-Gly, D-Tyr o N-Me-Tyr;

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida; y

en donde el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente directamente o por medio de un grupo de enlace a uno o más polímeros de polietilen glicol (PEG).

En diversas modalidades, el puente de triazol es  o , en donde la línea ondulada individual (~~~~) indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles (~~~~) indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina; y en donde x es 1, 2, 3 o 4; y

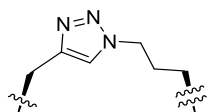
es 2, 3 o 4. En una modalidad específica, el puente de triazol es . En una modalidad

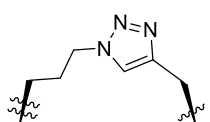
específica, el puente de triazol es .

En una modalidad específica, x es 1, 2, 3 o 4. En una modalidad preferida, x es 1, 2 o 3. En una modalidad específica, x es 1 o 2. En una modalidad, x es 1. En otra modalidad, x es 2.

En una modalidad específica, y es 2, 3 o 4. En una modalidad específica, y es 2 o 3. En una modalidad, y es 3. En otra modalidad, y es 2.

En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3, e y es 2. En una modalidad específica, x es 1, 2 o 3, e y es 3. En una modalidad específica, x es 1 o 2, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 1 o 3, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 2 o 3, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 1, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 2, e y es 2 o 3. En una modalidad específica, x es 3, e y es 2 o 3. En una modalidad preferida, x es 1, e y es 3. En una modalidad preferida, x es 2, e y es 3. En una modalidad preferida, x es 2, e y es 2.

En una modalidad específica, el puente de triazol es , en donde la línea ondulada individual (~~~~) indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles (~~~~) indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina.

En una modalidad específica, el puente de triazol es , en donde la línea ondulada individual (~~~~) indica el punto de unión del puente de triazol para el carbono C¹ del análogo de péptido de conotoxina, y las líneas onduladas dobles (~~~~) indican el punto de unión del puente de triazol para el carbono C² del análogo de péptido de conotoxina.

En una modalidad específica, X es X_{AA}¹. En una modalidad específica, X es X_{AA}¹ X_{AA}².

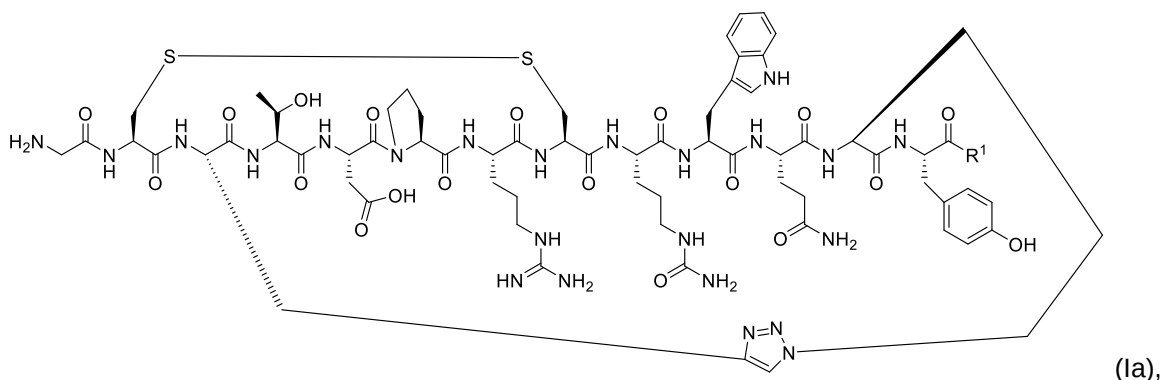
En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr, Phe o Trp. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr, D-Tyr o Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr o D-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Tyr o Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es D-Tyr o Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es D-Phe. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es Trp. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es D-Trp. En una modalidad específica, X_{AA}¹ es D-Tyr. En una modalidad preferida, X_{AA}¹ es Tyr.

En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Gly, D-Tyr, o N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Gly o D-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es D-Tyr o N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Gly o N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Gly. En una modalidad específica, X_{AA}² es N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² es D-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}² está opcionalmente presente. En una modalidad específica, X_{AA}² está presente. En una modalidad específica, X_{AA}² está ausente.

En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, Phe, D-Tyr, (Tyr)-(D-Tyr), (Tyr)-(N-Me-Gly), (Tyr)-(N-Me-Tyr), N-Me-Tyr, D-Arg, N-Me-D-Tyr, beta-Tyr, y N-Me-Arg. En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, Phe, D-Tyr, (Tyr)-(D-Tyr), (Tyr)-(N-Me-Gly), y (Tyr)-(N-Me-Tyr). En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, Phe, y D-Tyr. En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en (Tyr)-(D-Tyr), (Tyr)-(N-Me-Gly), y (Tyr)-(N-Me-Tyr). En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en N-Me-Tyr, D-Arg, N-Me-D-Tyr, beta-Tyr, y N-Me-Arg. En una modalidad específica, X es Tyr. En una modalidad específica, X es Phe. En una modalidad específica, X es D-Tyr. En una modalidad específica, X es (Tyr) - (D-Tyr). En una modalidad específica, X es (Tyr) - (N-Me-Gly). En una modalidad específica, X es (Tyr) - (N-Me-Tyr). En una modalidad específica, X es N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X es D-Arg. En una modalidad específica, X es N-Me-D-Tyr. En una modalidad específica, X es beta-Tyr. En una modalidad específica, X es N-Me-Arg.

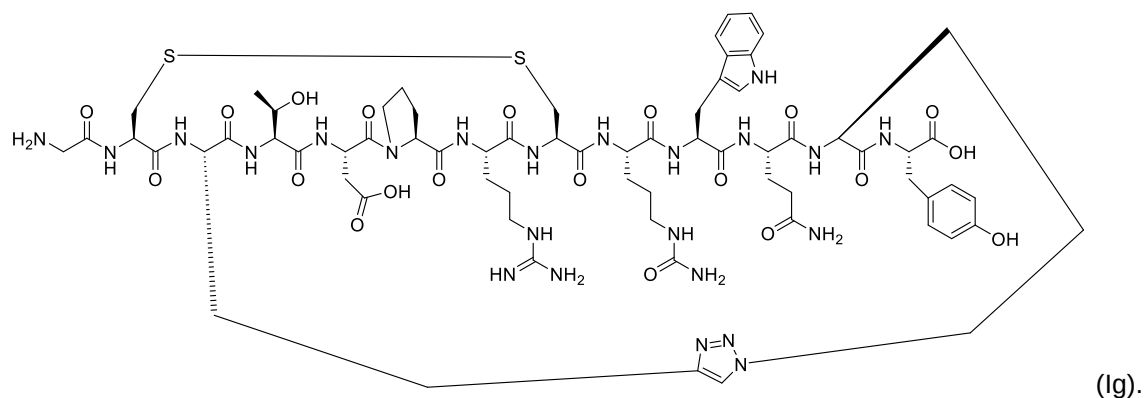
En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida. En una modalidad preferida, el término C del análogo de péptido de conotoxina es OH. En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es NH₂.

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ia) (SEQ ID NO: 94):

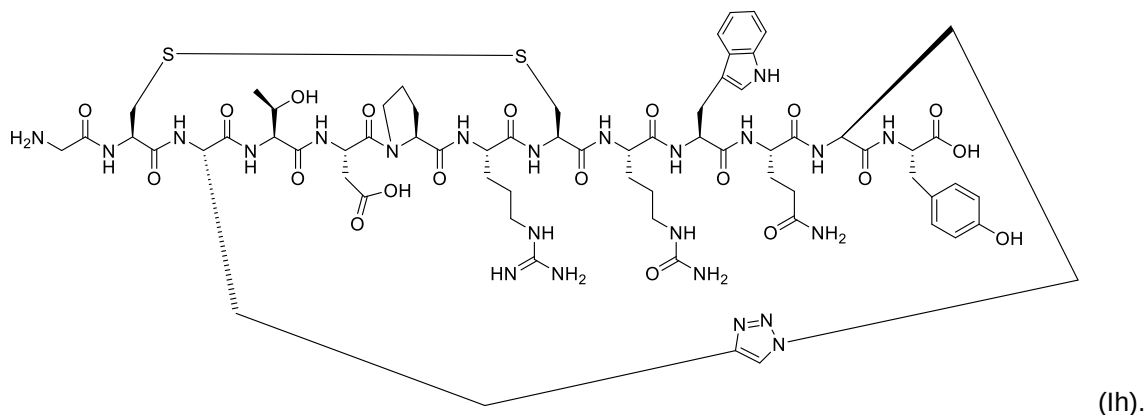


en donde R¹ es OH o NH₂. En una modalidad específica, R¹ es OH. En una modalidad específica, R¹ es NH₂.

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ig) (SEQ ID NO: 30):



En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ih) (SEQ ID NO: 33):



10



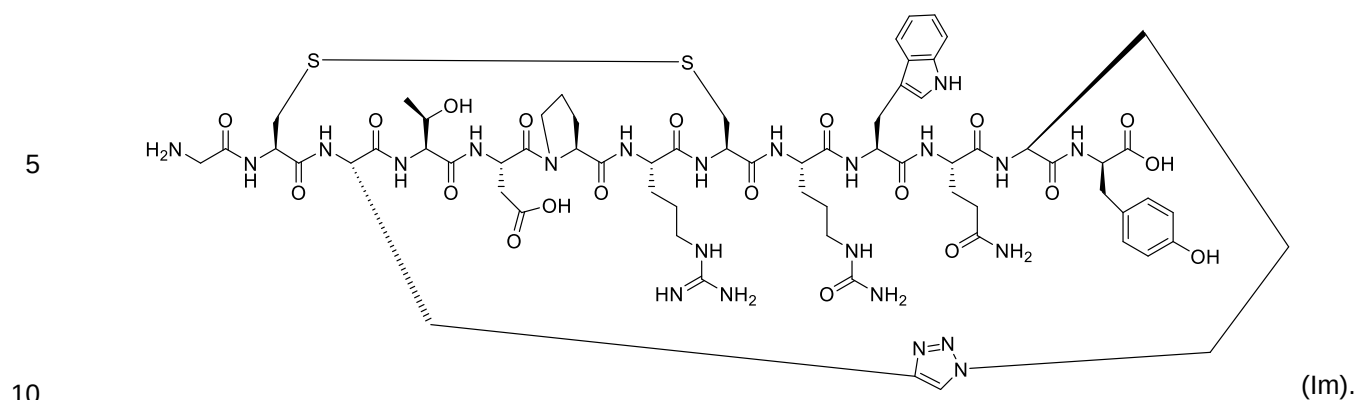
15



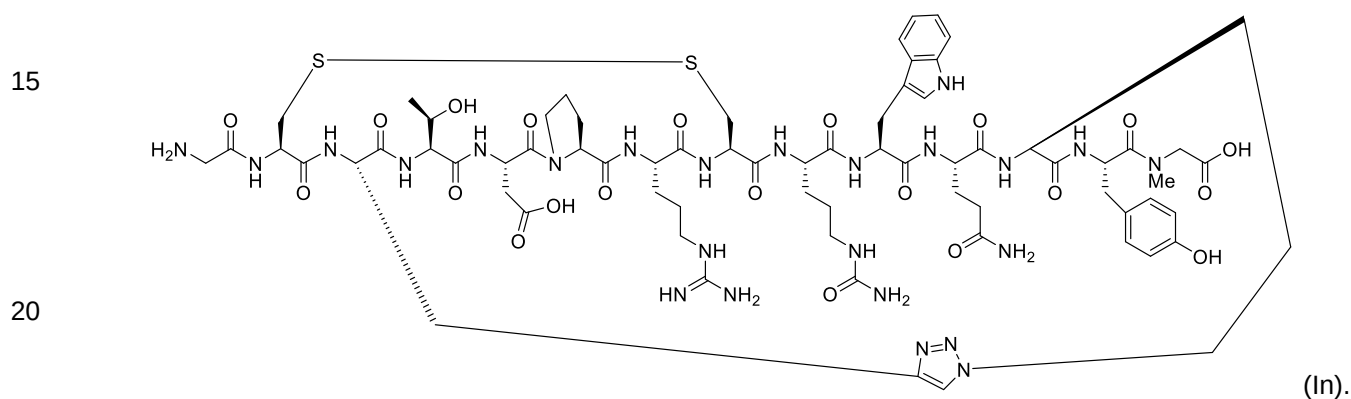
25



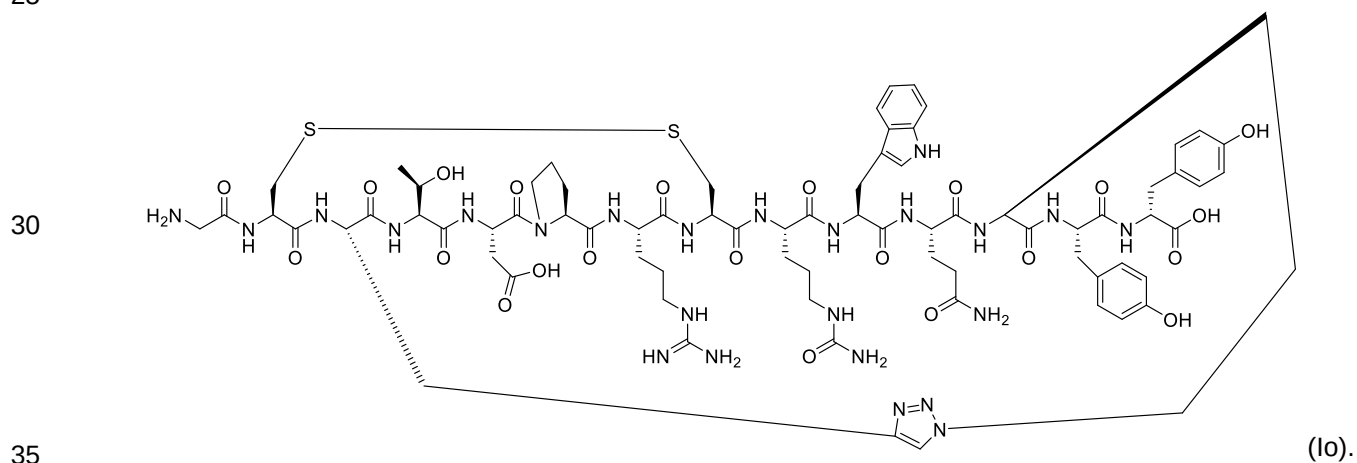
35



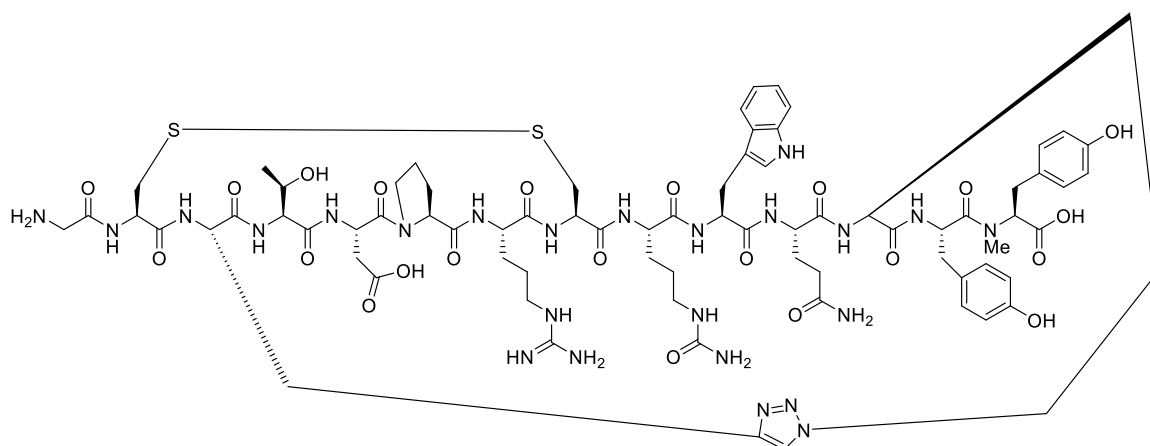
En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (In) (SEQ ID NO: 51):



En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Io) (SEQ ID NO: 54):

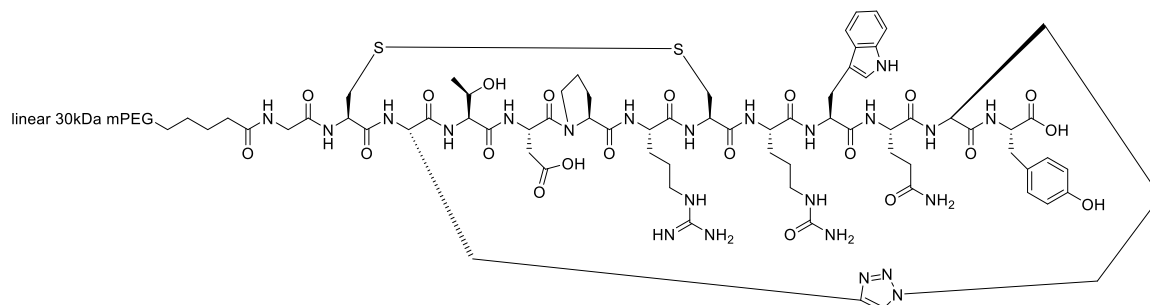


En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina o la sal farmacéuticamente aceptable de la fórmula (I) es de la fórmula (Ip) (SEQ ID NO: 57):



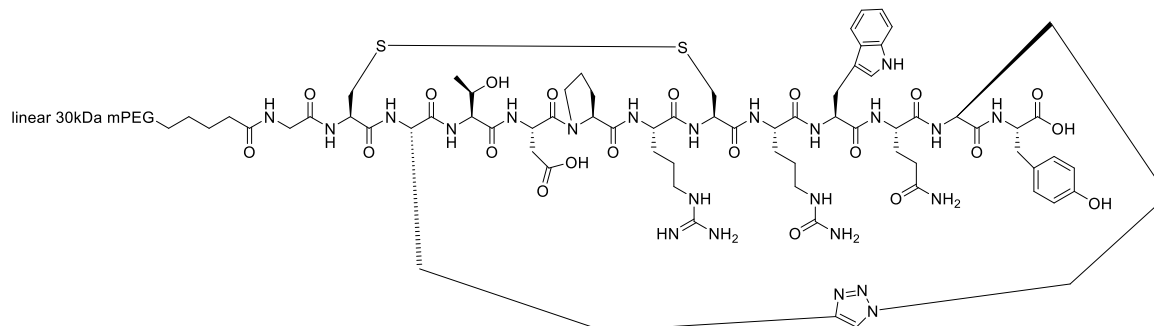
(Ip).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIa)
(SEQ ID NO: 83):



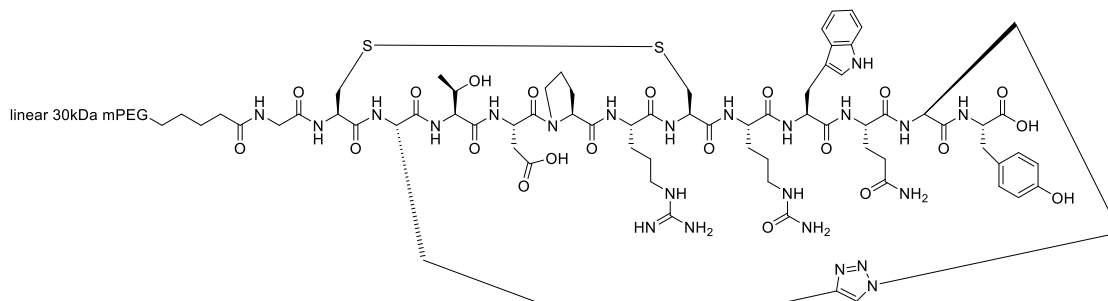
(IIa).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIg)
(SEQ ID NO: 95):



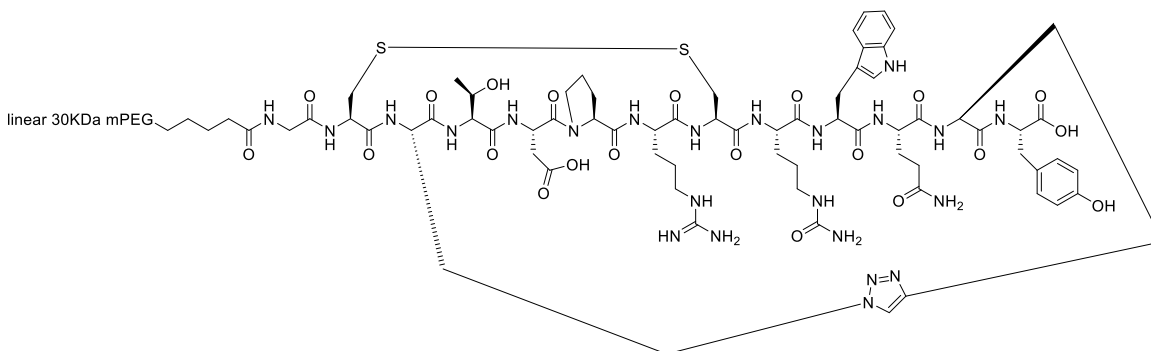
(IIg).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIh)
(SEQ ID NO: 96):



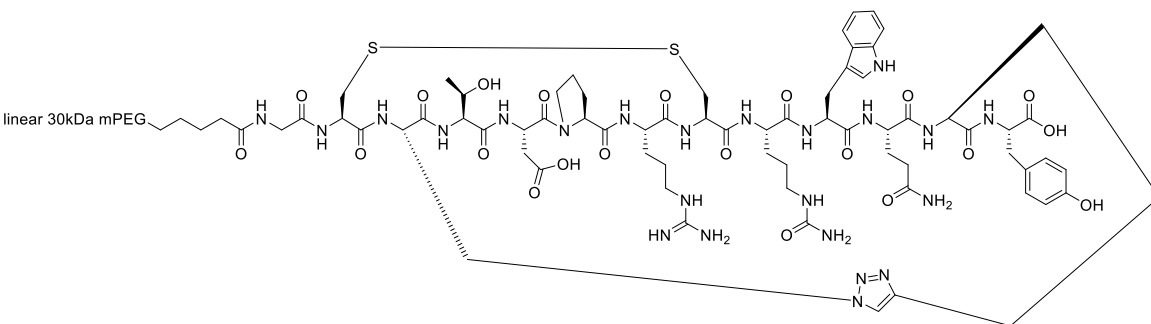
(IIh).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIi) (SEQ ID NO: 97):



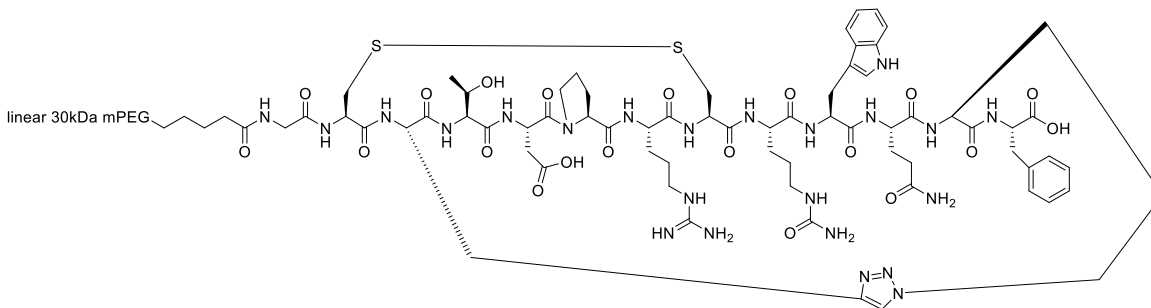
(IIi).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIk) (SEQ ID NO: 98):



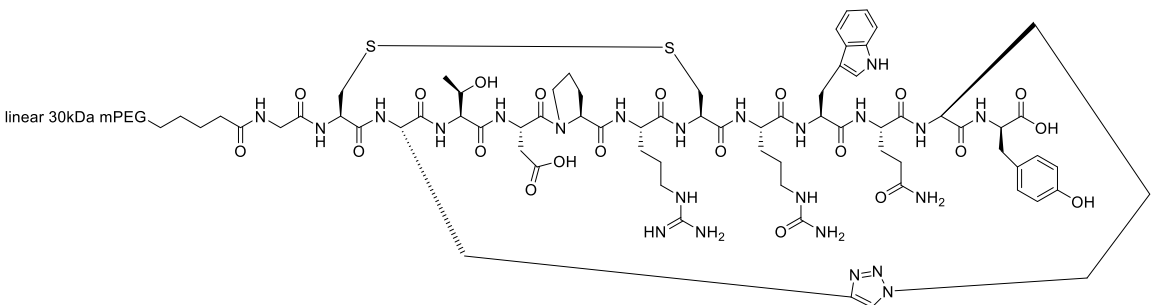
(IIk).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (III) (SEQ ID NO: 99):



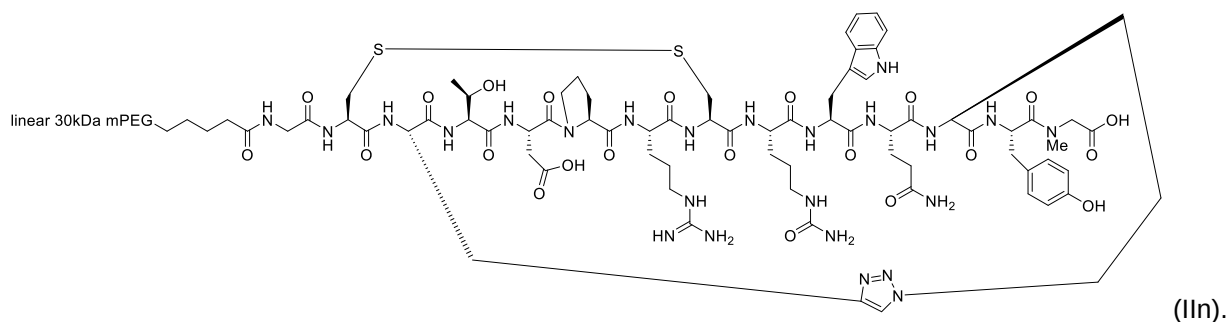
(III).

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIIm) (SEQ ID NO: 100):

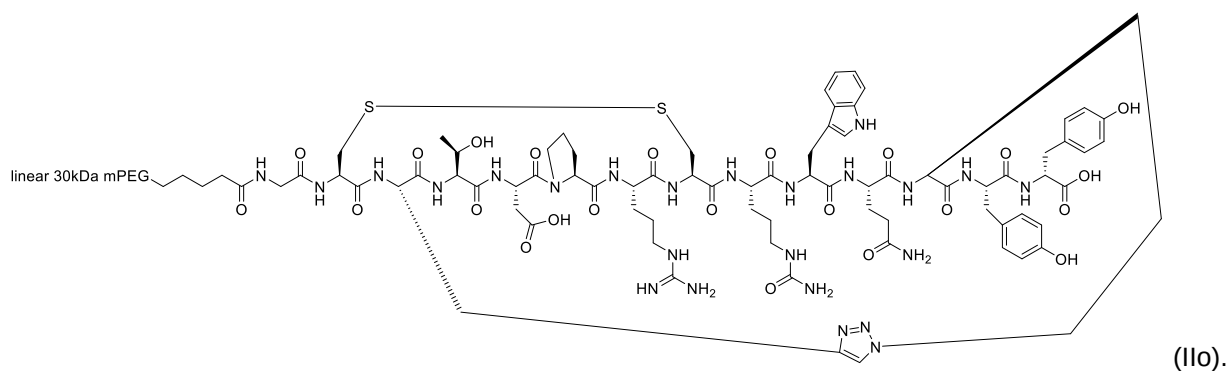


(IIIm).

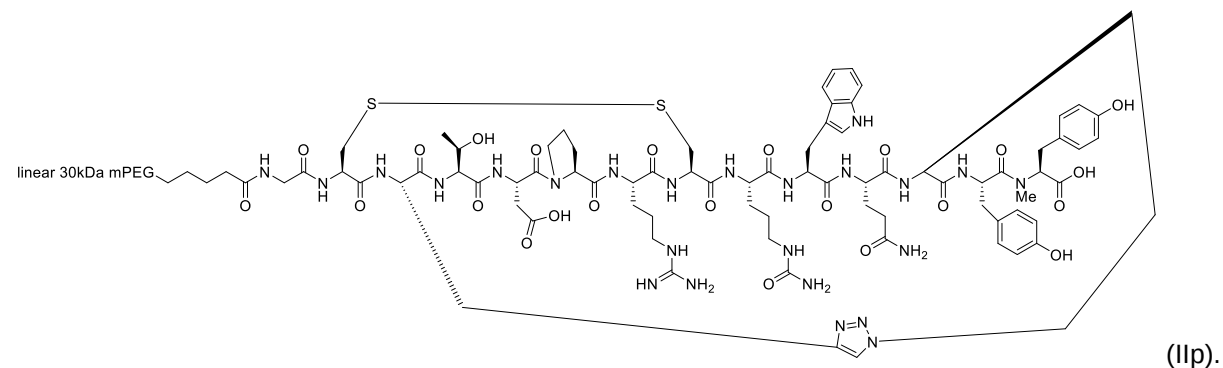
En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIIn) (SEQ ID NO: 101):



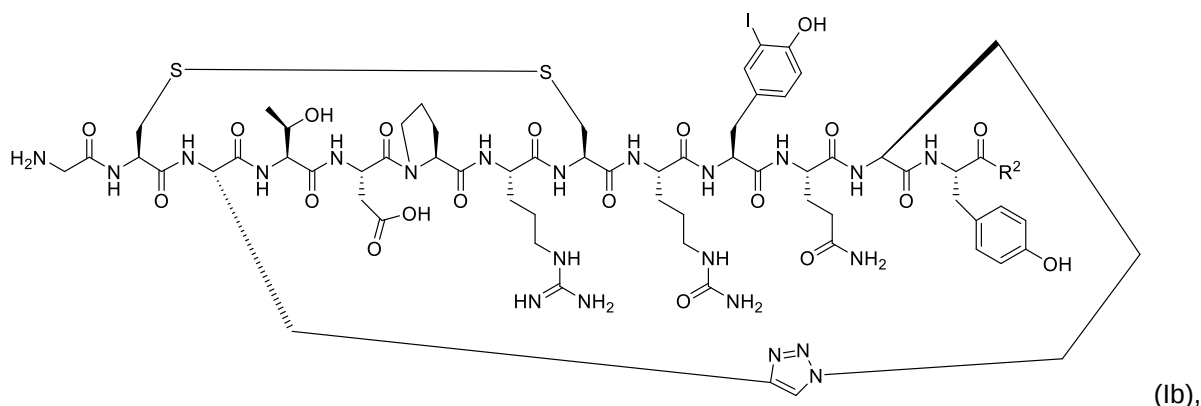
En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIo) (SEQ ID NO: 102):



En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIp) (SEQ ID NO: 103):



En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde el análogo de péptido de conotoxina es de la fórmula (Ib) (SEQ ID NO: 104):

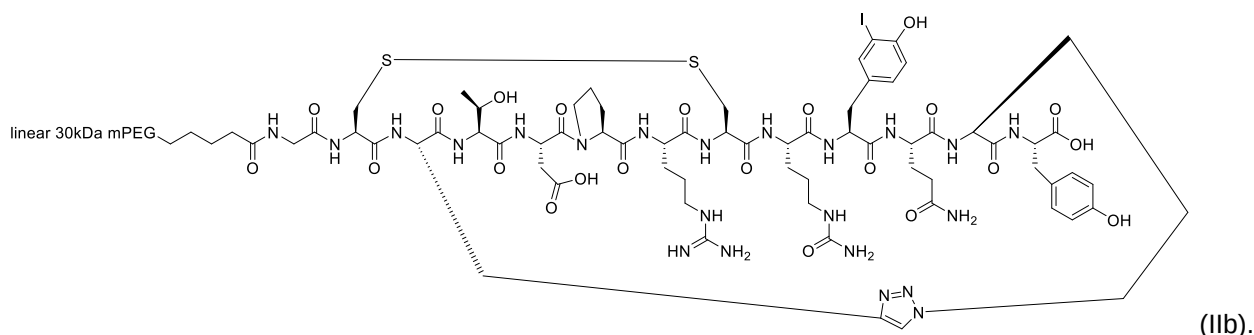


en donde R² es OH o NH₂; y

en donde el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente directamente o por medio de un grupo de enlace a uno o más polímeros de polietilen glicol (PEG).

En una modalidad específica de la fórmula (Ib), R² es OH. En una modalidad específica de la fórmula (Ib), R² es NH₂.

En las modalidades específicas, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado es de la fórmula (IIb) (SEQ ID NO: 105):



5.4. Composiciones Farmacéuticas

También se proporcionan en el presente documento las “composiciones farmacéuticas”, las cuales comprenden un análogo de péptido de conotoxina como se proporciona en el presente documento o un análogo de péptido de conotoxina PEGilado como se proporciona en este documento, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En una modalidad particular, un análogo de péptido de conotoxina está presente en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una modalidad particular, un análogo de péptido de conotoxina está presente en una cantidad profilácticamente eficaz. Las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar de acuerdo con los métodos y usos que se proporcionan en este documento. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto con el fin de practicar los métodos de tratamiento o de prevención y los usos que se proporcionan en este documento. Las composiciones farmacéuticas que se proporcionan en este documento se pueden formular de un modo tal como para que sean compatibles con el método o la vía de administración prevista; las vías de administración a modo de ejemplo se estipulan en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas comprenden por lo regular una cantidad terapéuticamente eficaz

de por lo menos uno de los análogos de péptidos de conotoxina o de los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados que se proporcionan en este documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico), conservadores (por ejemplo, alcohol bencílico, metil parabenos, p-hidroxibenzoato), agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes dispersantes, disolventes, reguladores del pH, lubricantes, rellenos, y/o diluyentes. Por ejemplo, un vehículo adecuado puede ser una solución salina fisiológica. Los reguladores del pH típicos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, los ácidos débiles o las bases débiles farmacéuticamente aceptables, o las mezclas de los mismos. Los componentes del regulador del pH también pueden incluir reactivos solubles en agua tales como ácido fosfórico, los ácidos tartáricos, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, y las sales de los mismos.

Un vehículo puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables para modificar o mantener el pH, la osmolaridad, la viscosidad, o la estabilidad de la composición farmacéutica. En una modalidad específica, el vehículo es un regulador acuoso. En una modalidad específica, un vehículo comprende, por ejemplo, cloruro de sodio.

Las composiciones farmacéuticas que se proporcionan en este documento pueden contener aún otros agentes de formulación farmacéuticamente aceptables para modificar o mantener la velocidad de liberación de un análogo de péptido de conotoxina descrito en este documento. Tales agentes de formulación incluyen, por ejemplo, aquellas sustancias conocidas por los expertos en la técnica para la preparación de formulaciones de liberación sostenida o de liberación controlada. En cuanto a los agentes de formulación farmacéuticamente aceptables, véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) páginas 1435-1712, y The Merck Index, 12a Ed. (1996, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ).

En una modalidad específica, una composición farmacéutica se proporciona en un frasco estéril como una solución, suspensión, gel, emulsión, o como un polvo deshidratado o liofilizado. Tales composiciones, por ejemplo, se pueden almacenar ya sea en una forma lista para usarse, en una forma liofilizada que requiera de su reconstitución antes de usarse, o bien en una forma líquida que requiera de su dilución antes de usarse. En las modalidades específicas, una composición farmacéutica se proporciona en un envase de un solo uso (por ejemplo, en un frasco, una ampolleta, una jeringa, o un autoinyector de un solo uso). En una modalidad específica, una composición farmacéutica se proporciona en un envase de múltiples usos (por ejemplo, en un frasco o cartucho de múltiples usos). Se puede utilizar cualquier aparato de suministro de medicamento para suministrar un análogo de péptido de conotoxina o un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento, el cual incluye implantes (por ejemplo, bombas implantables) y catéteres. En una modalidad específica, se pueden utilizar inyecciones de depósito para liberar un análogo de péptido de conotoxina o un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o una composición farmacéutica como se describen en el presente documento durante un periodo de tiempo definido. Las inyecciones de depósito se administran en general por la vía subcutánea o intramuscular.

Una composición farmacéutica se puede formular de un modo tal como para ser compatible con su vía de administración prevista, como se describe en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una suspensión acuosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular a través del uso de agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión conocidos por los expertos en la técnica. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. En una modalidad, la solución inyectable estéril puede ser, por ejemplo, una solución en 1, 3-butano diol. Los diluyentes, disolventes o medios de dispersión aceptables que se pueden emplear incluyen agua, solución de Ringer, solución salina, Cremophor EL^{MR}, solución salina regulada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), etanol, poliol (por ejemplo, glicerol o polietilen glicol líquido), y mezclas de los mismos. La absorción prolongada de las formulaciones inyectables particulares se puede lograr por medio de la inclusión de un agente que retarde la absorción (por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina).

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir vehículos para proteger a la composición contra la degradación o eliminación del cuerpo. Se pueden incluir diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, ácido ascórbico, o timerosal en la composición farmacéutica.

5.5. Métodos de tratamiento o prevención

En una modalidad, en el presente documento se proporciona un método para tratar o prevenir una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR), el cual comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de péptido de conotoxina como se describe en el presente documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado como se describe en el presente documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica como se describe en este documento.

En una modalidad preferida, la afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR) es una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición del subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR.

En una modalidad específica, la afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un nAChR que contiene $\alpha 9$, por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR, es el dolor o la inflamación.

En una modalidad preferida, el método que se proporciona en la presente memoria descriptiva es un método para el tratamiento de una afección propicia para el tratamiento por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR), el cual comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de péptido de conotoxina como se describe en este documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado como se describe en el presente documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica como se describe en este documento.

En una modalidad preferida, la afección propicia para el tratamiento por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR) es una afección propicia para el tratamiento por medio de la inhibición del subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR.

En una modalidad específica, la afección propicia para el tratamiento por medio de la inhibición de un nAChR que contiene $\alpha 9$, por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR, es el dolor o la inflamación.

En una modalidad preferida, el método que se proporciona en la presente memoria descriptiva es un método para prevenir una afección propicia para la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR), el cual comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de péptido de conotoxina como se describe en este documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado como se describe en el presente documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica como se describe en este documento.

En una modalidad preferida, la afección propicia para la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR) es una afección propicia para el tratamiento por medio de la inhibición del subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR.

En una modalidad específica, la afección propicia para la prevención por medio de la inhibición de un nAChR que contiene $\alpha 9$, por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR, es el dolor o la inflamación.

En una modalidad específica, la afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$, por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR, es el dolor. En una modalidad específica, el dolor se selecciona a partir del grupo que consiste en dolor general, dolor crónico, dolor neuropático, dolor nociceptivo, dolor inflamatorio, dolor inducido por daño a los nervios periféricos, dolor inducido por un trastorno inflamatorio, dolor inducido por un trastorno metabólico, dolor inducido por el cáncer, dolor inducido por la quimioterapia, dolor inducido por un procedimiento quirúrgico, y el dolor inducido por una quemadura. En una modalidad específica, el dolor es el dolor crónico relacionado con el cáncer. En una modalidad específica, el dolor es un dolor asociado con la neuropatía que, a modo de ejemplo, puede ser una neuropatía inducida por fármacos (por ejemplo, por la quimioterapia contra el cáncer) o una neuropatía inducida por una infección. En una modalidad específica, el dolor es neuralgia, la cual incluye, pero no se limita a, neuralgia postherpética, por ejemplo, neuralgia postherpética debida a herpes zóster.

En una modalidad específica, la afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$, por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR, es una afección inflamatoria. En una modalidad específica, la afección inflamatoria se selecciona a partir del grupo que consiste en inflamación, inflamación crónica, una enfermedad reumática, sepsis, fibromialgia, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, endometriosis, fibromas uterinos, una enfermedad inflamatoria de la piel, una afección inflamatoria de los pulmones, una enfermedad asociada con la inflamación del sistema nervioso, una enfermedad periodontal, y una enfermedad cardiovascular. En una modalidad específica, la afección inflamatoria es mediada por las células inmunitarias. En una modalidad específica, la afección inflamatoria es una inflamación de largo plazo y/o neuropatía periférica

después de una lesión.

En una modalidad específica, la afección asociada con el receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$, por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR, es el dolor y la inflamación. En una modalidad específica, la afección asociada con el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR es la inflamación y la neuropatía.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para el tratamiento o la prevención de una afección asociada con la activación de un nAChR que contiene $\alpha 9$, por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR, en un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de péptido de conotoxina como se describe en el presente documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado como se describe en el presente documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica como se describe en este documento.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para el tratamiento o la prevención del dolor o de la inflamación en un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de péptido de conotoxina como se describe en el presente documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado como se describe en el presente documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica como se describe en este documento. En una modalidad específica de un método para el tratamiento o la prevención del dolor, el dolor es un dolor asociado con la neuropatía, la cual, a modo de ejemplo, puede ser una neuropatía inducida por fármacos (por ejemplo, por la quimioterapia contra el cáncer) o una neuropatía inducida por una infección. En una modalidad específica, el dolor es neuralgia, la cual incluye, pero no se limita a, neuralgia postherpética, por ejemplo, neuralgia postherpética debida a herpes zóster.

En una modalidad específica, el método que se proporciona en la presente memoria descriptiva es un método para el tratamiento del dolor o de la inflamación. En una modalidad específica, el método que se proporciona en la presente memoria descriptiva es un método para el tratamiento del dolor. En una modalidad específica, el método que se proporciona en la presente memoria descriptiva es un método para el tratamiento de la inflamación.

En una modalidad específica, el método que se proporciona en la presente memoria descriptiva es un método para la prevención del dolor o de la inflamación. En una modalidad específica, el método que se proporciona en la presente memoria descriptiva es un método para la prevención del dolor. En una modalidad específica, el método que se proporciona en la presente memoria descriptiva es un método de prevención de la inflamación.

En una modalidad específica, el método para la prevención del dolor es para prevenir el dolor asociado con la neuropatía. En una modalidad específica de dicho método, el dolor asociado con la neuropatía es neuralgia. En una modalidad específica, la neuralgia es una neuralgia postherpética. En una modalidad específica, el método para la prevención del dolor es para prevenir el dolor inducido por la quimioterapia del cáncer (y por lo tanto, se administra al paciente un análogo de péptido de conotoxina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo antes de que se administre al paciente la quimioterapia

del cáncer). En una modalidad específica, el método para la prevención del dolor es para prevenir el dolor inducido por un procedimiento quirúrgico; en una modalidad específica de dicho método, se administra un análogo de péptido de conotoxina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo antes de, y/o simultáneamente con, el procedimiento quirúrgico, en particular, cuando se espere razonablemente que el procedimiento quirúrgico provoque dolor y/o inflamación.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para inhibir un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR), por ejemplo, el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR, en un sujeto, el cual comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de péptido de conotoxina como se describe en el presente documento o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica como se describe en este documento.

En las modalidades específicas, “tratar”, “tratando”, “tratamiento” y similares se refieren a una acción (tal como a la administración de un análogo de péptido de conotoxina o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica que comprende un análogo de péptido de conotoxina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) que se inicia después de que se ha diagnosticado, observado, y similares, una enfermedad, trastorno o afección, o un síntoma de los mismos, con el fin de eliminar, reducir, suprimir, mitigar o mejorar, ya sea de una forma temporal o permanente, por lo menos una de las causas subyacentes de una enfermedad, trastorno o afección que aflija a un sujeto, o por lo menos uno de los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o afección que aflija a un sujeto. Por lo tanto, el tratamiento puede incluir la inhibición (es decir, detener el desarrollo o un mayor desarrollo de la enfermedad, trastorno o afección, o los síntomas clínicos asociados con la misma) de una enfermedad activa.

En las modalidades específicas de la invención en donde se lleva a cabo un método de prevención, no es necesario que la prevención sea completa; en una modalidad específica, la prevención es una inhibición parcial o una prevención parcial o una reducción en la enfermedad, afección o trastorno en relación con lo que de algún otro modo se esperaría que ocurriera si estuviera ausente la administración del análogo de péptido de conotoxina o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En las modalidades específicas, la administración puede ser por medio de la inyección o de algún otro modo el suministro físico de un análogo de péptido de conotoxina a un paciente, tal como por medio de un suministro a las mucosas, intradérmico, intravenoso, intramuscular y/o cualquier otro método de suministro físico descrito en este documento o conocido en la técnica. Cuando se está tratando una enfermedad, trastorno o afección, o un síntoma de los mismos, la administración del análogo de péptido de conotoxina o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se produce por lo regular después de la aparición de la enfermedad, trastorno o afección, o del síntoma de los mismos. Cuando se está previniendo una enfermedad, trastorno o afección, o un síntoma de los mismos, la administración del análogo de péptido de conotoxina o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se produce por lo regular antes de la aparición de la enfermedad, trastorno o afección, o del síntoma de los mismos. En una modalidad específica, un análogo de péptido de conotoxina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra antes y después de la aparición del dolor y/o de la inflamación tanto para prevenir como para

tratar el dolor y/o la inflamación.

En diversas modalidades, un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se describe en el presente documento, se usa en cualquiera de los métodos que se proporcionan en este documento. Por ejemplo, un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, que se proporcionan en este documento, se puede utilizar en un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno o afección descritos en este documento. Por lo tanto, un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se proporcionan en el presente documento, puede ser para usarse como un medicamento. Un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se proporcionan en este documento, puede ser para usarse en un método para tratar o prevenir una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR), por ejemplo el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR. Un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se proporcionan en este documento, puede ser para usarse en un método para tratar o prevenir una afección propicia para el tratamiento o la prevención por medio de la inhibición de un receptor de acetilcolina nicotínico que contiene $\alpha 9$ (nAChR), por ejemplo el subtipo $\alpha 9\alpha 10$ de nAChR. Por ejemplo, un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se proporcionan en el presente documento, pueden ser para usarse en un método para el tratamiento o la prevención del dolor o de la inflamación.

5.6. Vías de administración y dosificación

Un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se describen en este documento, se puede administrar a un paciente a través de cualquiera de una variedad de vías. Estas incluyen, pero no se limitan a, las vías parenteral, intra-articular, intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, tópica, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, intravenosa, intratumoral, conjuntival, subcutánea y pulmonar. En una modalidad específica, un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se describen en este documento, se administra a través de una administración subcutánea. En una modalidad específica, un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se describen en este documento, se administra a través de una administración intravenosa. En una modalidad

específica, un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se describen en este documento, se administra a través de una administración intra-articular.

La cantidad de un análogo de péptido de conotoxina, el cual incluye, pero no se limita a, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se va a administrar al paciente, dependerá de la naturaleza de la enfermedad y de la condición del paciente, y se puede determinar por medio de las técnicas clínicas estándares y con el conocimiento del médico.

La dosis precisa y el régimen que se van a emplear en una composición dependerán también de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad, y se deben decidir de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. La determinación de la dosificación apropiada puede ser determinada por un experto en la técnica médica. La dosificación diaria total se puede dividir y administrar en porciones durante todo el día o a través de medios que proporcionen un suministro continuo.

En una modalidad específica, un análogo de péptido de conotoxina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un sujeto humano en una dosis de entre 0.01 y aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal. En una modalidad específica, un análogo de péptido de conotoxina, por ejemplo, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra a un sujeto humano en una dosis de aproximadamente 0.5 mg por kg de peso corporal. En las modalidades específicas, la dosis humana es de 1 a 1000 mg al día. En las modalidades específicas, la dosis humana diaria es de 1 a 750 mg al día; o de 10 a 500 mg al día.

Una análogo de péptido de conotoxina, por ejemplo, un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica, como se dan a conocer en este documento, se puede administrar todo a la vez, o múltiples veces en intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación precisa y la duración del tratamiento pueden variar con la edad, el peso y el estado del paciente que se esté tratando, y se pueden determinar empíricamente a través del uso de los protocolos de ensayo conocidos o por medio de una extrapolación a partir de los datos de prueba o de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*. Se entiende además que para cualquier individuo en particular, los regímenes de dosificación específicos se pueden ajustar a través del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las formulaciones.

5.7. Pacientes

El paciente al que se hace referencia en esta divulgación, puede ser, pero no se limita a, un vertebrado humano o no humano, tal como un animal salvaje, doméstico o de granja. En una modalidad específica, el paciente es un mamífero, por ejemplo, un ser humano, una vaca, un perro, un gato, una cabra, un caballo, una oveja, un cerdo, un conejo, una rata, o un ratón. En una modalidad preferida, el paciente es un paciente humano.

En una modalidad específica, el paciente humano es un adulto (de por lo menos 16 años de edad). En otra modalidad específica, el paciente humano es un adolescente (de 12 a 15 años de edad). En otra modalidad específica, el paciente es un niño (menor de 12 años de edad).

5.8. Métodos de preparación de análogos de péptidos de conotoxina

Esta divulgación proporciona los métodos para la preparación de los análogos de péptidos de conotoxina, en donde los análogos de péptidos de conotoxina intermediarios (antes de la formación del puente de triazol) se someten a las condiciones de formación de triazol para formar los análogos de péptidos de conotoxina de la invención.

5.8.1. Análogos de péptidos de conotoxina intermediarios

Esta divulgación proporciona las síntesis de los análogos de péptidos de conotoxina intermediarios para la síntesis de los análogos de péptidos de conotoxina con un puente de triazol. Un análogo de péptido de conotoxina intermediario, por ejemplo, se puede sintetizar a través del uso de la síntesis de péptidos en fase sólida. Cuando se lleva a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden introducir en el péptido (por ejemplo, un péptido de conotoxina de RglA) los aminoácidos necesarios con los grupos de reacción apropiados (por ejemplo, un grupo azida o un grupo acetileno) para la formación de un puente de triazol. Los aminoácidos necesarios se pueden introducir en las posiciones 3 y 12 del análogo de péptido de conotoxina de RglA.

En una de las posiciones 3 y 12 se introduce un residuo de aminoácido que lleva un grupo acetileno (por ejemplo, (S)-propargil glicina, (S)-homopropargil glicina, o (S)-bishomopropargil glicina), y en la otra posición se introduce un aminoácido que lleva un grupo azida (por ejemplo, (S)-azidoalanina, (S)-azidohomoalanina, (S)-azidonorvalina), por medio de lo cual el grupo acetileno y el grupo azida que están dentro del mismo péptido de conotoxina intermediario pueden formar un anillo de triazol cuando el péptido de conotoxina intermediario se somete a las condiciones de formación de triazol, con lo que se forma de este modo un puente de triazol en el análogo de péptido de conotoxina resultante.

En una modalidad específica, los aminoácidos necesarios para la formación del puente de triazol se seleccionan, por ejemplo, a partir del grupo de (S)-propargil glicina, (S)-azidoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidohomoalanina, (S)-azidonorvalina, y (S)-bishomopropargil glicina.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un análogo de péptido de conotoxina intermediario o una sal del mismo, en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina es

Gly-Cys- X_{AA}^3 -Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 -Trp-Gln- X_{AA}^{12} -X (SEQ ID NO: 106),

en donde

X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-azidoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidohomoalanina, (S)-azidonorvalina y (S)-bishomopropargil glicina;

X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{12} se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidohomoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidonorvalina, y (S)-bishomopropargil glicina;

en donde cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-homopropargil glicina, y (S)-bishomopropargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidohomoalanina o (S)-azidonorvalina; y cuando X_{AA}^9 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidoalanina, (S)-azidohomoalanina, y (S)-azidonorvalina, X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina o (S)-bishomopropargil glicina;

X es X_{AA}^1 o $X_{AA}^1X_{AA}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-Me-Gly, D-Tyr, o N-Me-Tyr; y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina intermediario es un ácido carboxílico o un grupo amida.

5 En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina o (S)-azidoalanina. En una modalidad específica, en donde X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina o (S)-bishomopropargil glicina. En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina y X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina. En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-homopropargil glicina y X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina. En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-homopropargil glicina y X_{AA}^{12} es (S)-azidohomoalanina. En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-azidohomoalanina y X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina. En una modalidad específica, X_{AA}^3 es (S)-azidohomoalanina y X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina.

En una modalidad específica, X es X_{AA}^1 . En una modalidad específica, X es $X_{AA}^1X_{AA}^2$.

En una modalidad específica, X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es Tyr, Phe o Trp. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es Tyr, D-Tyr o Phe. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es Tyr o D-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es Tyr o Phe. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es D-Tyr o Phe. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es Phe. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es D-Phe. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es Trp. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es D-Trp. En una modalidad específica, X_{AA}^1 es D-Tyr. En una modalidad preferida, X_{AA}^1 es Tyr.

En una modalidad específica, X_{AA}^2 es N-Me-Gly, D-Tyr, o N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}^2 es N-Me-Gly o D-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}^2 es D-Tyr o N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}^2 es N-Me-Gly o N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}^2 es N-Me-Gly. En una modalidad específica, X_{AA}^2 es N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}^2 es D-Tyr. En una modalidad específica, X_{AA}^2 está opcionalmente presente. En una modalidad específica, X_{AA}^2 está presente. En una modalidad específica, X_{AA}^2 está ausente.

25 En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, Phe, D-Tyr, (Tyr)-(D-Tyr), (Tyr)-(N-Me-Gly), (Tyr)-(N-Me-Tyr), N-Me-Tyr, D-Arg, N-Me-D-Tyr, beta-Tyr, y N-Me-Arg. En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, Phe, D-Tyr, (Tyr)-(D-Tyr), (Tyr)-(N-Me-Gly), y (Tyr)-(N-Me-Tyr). En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en Tyr, Phe, y D-Tyr. En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en (Tyr)-(D-Tyr), (Tyr)-(N-Me-Gly), y (Tyr)-(N-Me-Tyr). En una modalidad específica, X se selecciona a partir del grupo que consiste en N-Me-Tyr, D-Arg, N-Me-D-Tyr, beta-Tyr, y N-Me-Arg. En una modalidad específica, X es Tyr. En una modalidad específica, X es Phe. En una modalidad específica, X es D-Tyr. En una modalidad específica, X es (Tyr) - (D-Tyr). En una modalidad específica, X es (Tyr) - (N-Me-Gly). En una modalidad específica, X es (Tyr) - (N-Me-Tyr). En una modalidad específica, X es N-Me-Tyr. En una modalidad específica, X es D-Arg. En una modalidad específica, X es N-Me-D-Tyr. En una modalidad específica, X es beta-Tyr. En una modalidad específica, X es N-Me-Arg.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida. En una modalidad preferida, el término C del análogo de péptido de

conotoxina es OH. En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina es NH₂.

En las modalidades específicas, X_{AA}³ es (S)-propargil glicina, X_{AA}¹² es (S)-azidonorvalina, X es Tyr. En una modalidad, el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico. En otra modalidad, el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo amida.

En una modalidad específica, X_{AA}³ es (S)-homopropargil glicina, X_{AA}¹² es (S)-azidonorvalina, X es Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En las modalidades específicas, X_{AA}³ es (S)-homopropargil glicina, X_{AA}¹² es (S)-azidohomoalanina, X es Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En las modalidades específicas, X_{AA}³ es (S)-azidohomoalanina, X_{AA}¹² es (S)-homopropargil glicina, X es Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En las modalidades específicas, X_{AA}³ es (S)-azidoalanina, X_{AA}¹² es (S)-bishomopropargil glicina, X es Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En las modalidades específicas, X_{AA}³ es (S)-propargil glicina, X_{AA}¹² es (S)-azidonorvalina, X es Phe; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En las modalidades específicas, X_{AA}³ es (S)-propargil glicina, X_{AA}¹² es (S)-azidonorvalina, X es D-Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En las modalidades específicas, X_{AA}³ es (S)-propargil glicina, X_{AA}¹² es (S)-azidonorvalina, X es Tyr-N-Me-Gly; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En las modalidades específicas, X_{AA}³ es (S)-propargil glicina, X_{AA}¹² es (S)-azidonorvalina, X es Tyr-D-Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En las modalidades específicas, X_{AA}³ es (S)-propargil glicina, X_{AA}¹² es (S)-azidonorvalina, X es Tyr-N-Me-Tyr; y en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un grupo de ácido carboxílico.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un análogo de péptido de conotoxina intermediario o una sal del mismo, en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina es

Gly-Cys-X_{AA}³-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-X_{AA}⁹-X_{AA}¹⁰-Gln-X_{AA}¹²-Tyr (SEQ ID NO: 107),

en donde

X_{AA}³ es (S)-propargil glicina;

X_{AA}⁹ es citrulina;

X_{AA}¹⁰ es 3-yodo-Tyr;

X_{AA}¹² es (S)-azidonorvalina;

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina intermediario es un ácido carboxílico o un grupo amida.

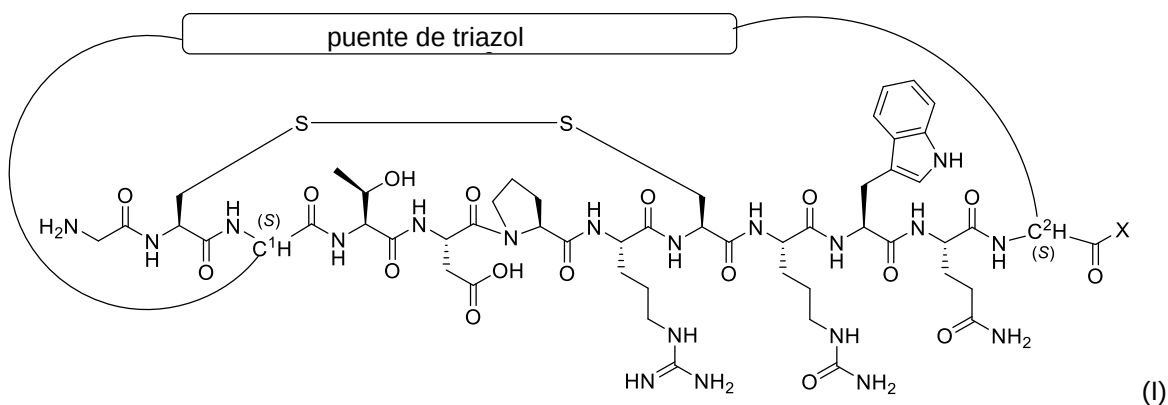
En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina intermediario es un grupo de ácido carboxílico.

En una modalidad específica, el término C del análogo de péptido de conotoxina intermediario es un grupo amida.

5.8.2. Formación de puente de triazol

Después de la síntesis de un péptido de conotoxina intermediario con los grupos necesarios para la formación de un puente de triazol en las posiciones 3 y 12 (que llevan un grupo acetileno y un grupo azida, respectivamente), el grupo acetileno y el grupo azida reaccionan bajo las condiciones de formación de triazol para proporcionar un triazol, con lo que se forma de este modo un puente de triazol en el análogo de péptido de conotoxina resultante.

En una modalidad específica, en el presente documento se proporciona un método para la elaboración de un análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I) (SEQ ID NO: 93) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en donde

X es X_{AA}^1 o $X_{AA}^1X_{AA}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-Me-Gly, D-Tyr, o N-Me-Tyr; y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I) es un ácido carboxílico o un grupo amida;

los cuales comprenden someter a un análogo de péptido de conotoxina intermediario o a una sal del mismo a condiciones de formación de triazol, en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina intermediario es Gly-Cys- X_{AA}^3 -Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 -Trp-Gln- X_{AA}^{12} -X (SEQ ID NO: 106),

en donde

X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-azidoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidohomoalanina, (S)-azidonorvalina y (S)-bishomopropargil glicina;

X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{12} se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidohomoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidonorvalina, y (S)-bishomopropargil glicina;

en donde, cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-homopropargil glicina, y (S)-bishomopropargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidohomoalanina o (S)-azidonorvalina; y cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidoalanina, (S)-azidohomoalanina, y (S)-azidonorvalina, X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina o (S)-bishomopropargil glicina;

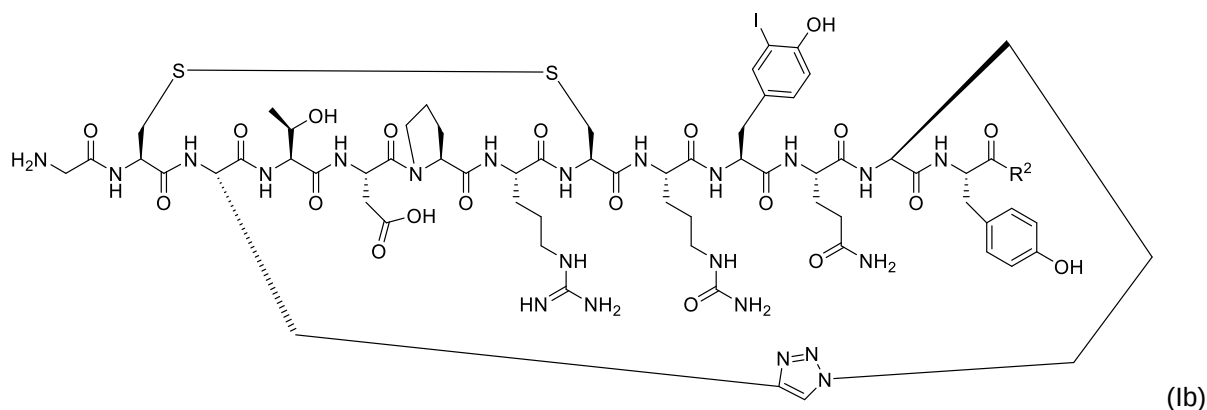
X es como se define anteriormente para el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I); y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina intermediario es como se define

anteriormente para el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I); y

en donde, bajo dichas condiciones de formación de triazol X_{AA}^3 reacciona con X_{AA}^{12} para formar el puente de triazol en el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I).

En aún otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para la elaboración de un análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (Ib) (SEQ ID NO: 104) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (Ib) es un ácido carboxílico o un grupo amida,

los cuales comprenden someter a un análogo de péptido de conotoxina intermediario o a una sal del mismo a condiciones de formación de triazol, en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina intermediario es Gly-Cys- X_{AA}^3 -Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 - X_{AA}^{10} -Gln- X_{AA}^{12} -Tyr (SEQ ID NO: 107),

en donde

X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina;

X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{10} es 3-yodo-Tyr;

X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina; y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina intermediario es como se define anteriormente para el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (Ib); y

en donde, bajo dichas condiciones de formación de triazol, X_{AA}^3 reacciona con X_{AA}^{12} para formar un puente de triazol como se representa en el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (Ib).

En una modalidad específica, las condiciones de formación de triazol son las condiciones para la "Química Clic" (es decir, la cicloadición 1, 3-dipolar de azidas y alquinos terminales) que se describe en Hein et al. Pharm. Res. 2008, 25 (10): 2216-2230. En una modalidad específica, las condiciones de formación de triazol incluyen la presencia de un catalizador de cobre. En una modalidad específica, las condiciones de formación de triazol incluyen la presencia de un catalizador de cobre y un reactivo reductor. En una modalidad, el catalizador de cobre es una sal de Cu (II). En una modalidad, el catalizador de cobre es $CuSO_4$. En una modalidad, el reactivo reductor es L-ácido ascórbico. En otra modalidad, el reactivo

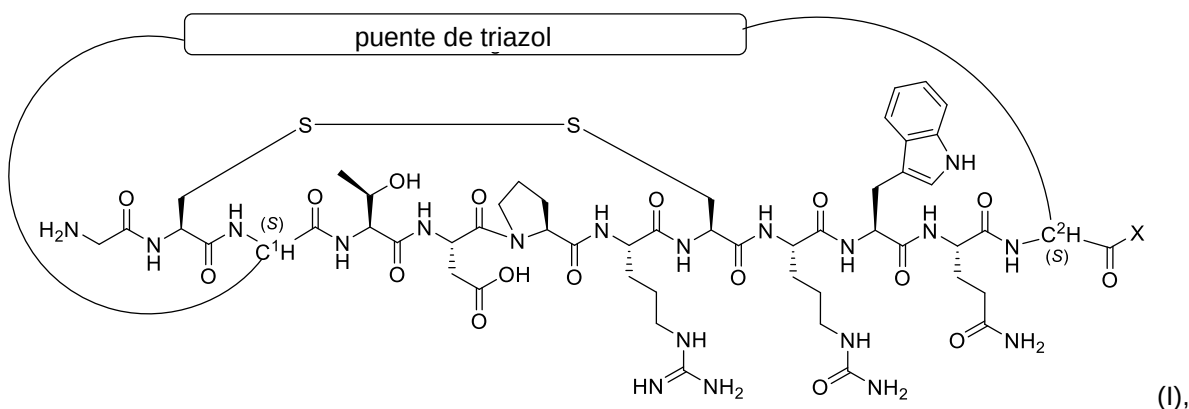
reductor es ascorbato de sodio. En una modalidad, las condiciones de formación de triazol incluyen la presencia de un catalizador de rutenio. En una modalidad, el catalizador de rutenio es $\text{Cp}^* \text{RuCl} (\text{PPh}_3)_3$. En algunas modalidades, las condiciones de formación de triazol son las condiciones libres de catalizador.

En una modalidad específica, una sal del análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I) o (Ib) se puede someter a los pasos de intercambio de sal para dar una sal farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, por ejemplo, una sal de TFA de un análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I) reacciona con una base en una solución acuosa (pH de 7.0 a 8.0) y luego reacciona con un ácido apropiado para dar una sal farmacéuticamente aceptable del análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I). En una modalidad, la base es $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ (ac.). En una modalidad, después de la reacción con una base en una solución acuosa, el análogo de péptido de conotoxina reacciona con ácido acético para dar una sal de acetato del análogo de péptido de conotoxina.

5.8.3. PEGilación

Los análogos de péptidos de conotoxina sintetizados además se pueden conjugar de una forma covalente con uno o más polímeros de polietilen glicol (PEG). Los análogos de péptidos de conotoxina, por ejemplo, se pueden unir directamente o por medio de un grupo de enlace a uno o más polímeros de PEG.

En una modalidad específica, en el presente documento se proporciona un método para la elaboración de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende poner en contacto, bajo condiciones de reacción, un análogo de péptido de conotoxina o una sal del mismo, con uno o más polímeros reactivos de polietilen glicol (PEG) con el fin de formar un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, en donde los polímeros reactivos de PEG comprenden cada uno un grupo reactivo enlazado de una forma covalente, opcionalmente a través de un grupo de enlace, a un polímero de PEG, y en donde cada grupo reactivo reacciona bajo las condiciones de reacción para formar un enlace covalente con el análogo de péptido de conotoxina por medio de lo cual el análogo de péptido de conotoxina se une directamente o por medio de un grupo de enlace a los uno o más polímeros de PEG. En una modalidad, el análogo de péptido de conotoxina es el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (I) (SEQ ID NO: 93):



en donde

X es X_{AA}^1 o $\text{X}_{\text{AA}}^1 \text{X}_{\text{AA}}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-

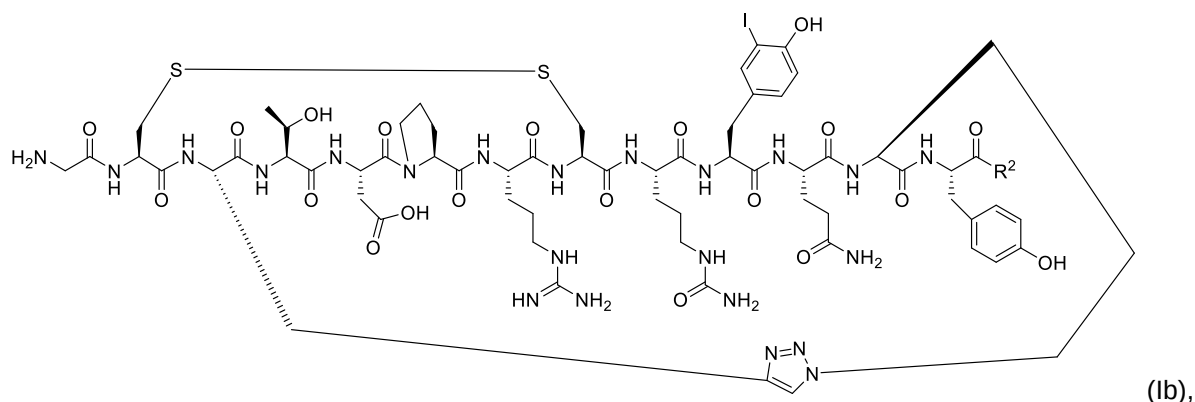
Me-Gly, D-Tyr, o N-Me-Tyr;

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida; y

en donde el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente directamente o por medio de un grupo de enlace a uno o más polímeros de polietilen glicol (PEG).

En una modalidad específica, en el presente documento se proporciona un método para la elaboración de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende poner en contacto, bajo condiciones de reacción, un análogo de péptido de conotoxina o una sal del mismo, con uno o más polímeros reactivos de polietilen glicol (PEG) con el fin de formar un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, en donde los polímeros reactivos de PEG comprenden cada uno un grupo reactivo enlazado de una forma covalente, opcionalmente a través de un grupo de enlace, a un polímero de PEG, y en donde cada grupo reactivo reacciona bajo las condiciones de reacción para formar un enlace covalente con el análogo de péptido de conotoxina por medio de lo cual el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente directamente o por medio de un grupo de enlace a los uno o más polímeros de PEG,

en donde el análogo de péptido de conotoxina es el análogo de péptido de conotoxina de la fórmula (Ib) (SEQ ID NO: 104):



en donde R^2 es OH o NH_2 .

En una modalidad específica, en el presente documento se proporciona un método para la elaboración de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende poner en contacto, bajo condiciones de reacción, un análogo de péptido de conotoxina o una sal del mismo, con uno o más polímeros reactivos de polietilen glicol (PEG) con el fin de formar un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, en donde los polímeros reactivos de PEG comprenden cada uno un grupo reactivo enlazado de una forma covalente, opcionalmente a través de un grupo de enlace, a un polímero de PEG, y en donde cada grupo reactivo reacciona bajo las condiciones de reacción para formar un enlace covalente con el análogo de péptido de conotoxina por medio de lo cual el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente directamente o por medio de un grupo de enlace a los uno o más polímeros de PEG,

en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina es Gly-Cys- X_{AA}^3 Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 Trp-Gln- X_{AA}^{12} -X (SEQ ID NO: 106),

en donde

X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-azidoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidohomoalanina, (S)-azidonorvalina y (S)-bishomopropargil glicina;

X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{12} se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidohomoalanina, (S)-homopropargil glicina, (S)-azidonorvalina, y (S)-bishomopropargil glicina;

en donde, cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-propargil glicina, (S)-homopropargil glicina, y (S)-bishomopropargil glicina, X_{AA}^{12} es (S)-azidohomoalanina o (S)-azidonorvalina; y cuando X_{AA}^3 se selecciona a partir del grupo que consiste en (S)-azidoalanina, (S)-azidohomoalanina, y (S)-azidonorvalina, X_{AA}^{12} es (S)-homopropargil glicina o (S)-bishomopropargil glicina;

X es X_{AA}^1 o $X_{AA}^1X_{AA}^2$; en donde X_{AA}^1 es Tyr, Phe, Trp, o un isómero D de Tyr, Phe o Trp, y X_{AA}^2 es N-Me-Gly, D-Tyr, o N-Me-Tyr; y

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida.

En aún otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para la elaboración de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende poner en contacto, en condiciones de reacción, un análogo de péptido de conotoxina o una sal del mismo, con uno o más polímeros reactivos de polietilen glicol (PEG) con el fin de formar un análogo de péptido de conotoxina PEGilado, en donde los polímeros reactivos de PEG comprenden cada uno un grupo reactivo enlazado de una forma covalente, opcionalmente a través de un grupo de enlace, a un polímero de PEG, y en donde cada grupo reactivo reacciona bajo las condiciones de reacción para formar un enlace covalente con el análogo de péptido de conotoxina por medio de lo cual el análogo de péptido de conotoxina se une de una forma covalente directamente o por medio de un grupo de enlace a los uno o más polímeros de PEG,

en donde la secuencia de aminoácidos del análogo de péptido de conotoxina es Gly-Cys- X_{AA}^3 Thr-Asp-Pro-Arg-Cys- X_{AA}^9 - X_{AA}^{10} -Gln- X_{AA}^{12} -Tyr (SEQ ID NO: 107),

en donde

X_{AA}^3 es (S)-propargil glicina;

X_{AA}^9 es citrulina;

X_{AA}^{10} es 3-yodo-Tyr;

X_{AA}^{12} es (S)-azidonorvalina;

en donde el término C del análogo de péptido de conotoxina es un ácido carboxílico o un grupo amida.

En una modalidad específica, las condiciones de reacción son las condiciones de PEGilación convencionales. En una modalidad, las condiciones de reacción son las condiciones de formación de amida

convencionales. Ciertas condiciones de formación de amida convencionales se describen en Valeur y Bradley, Chemical Society Reviews, 2009, 38: 606-631. En una modalidad, las condiciones de formación de amida incluyen la presencia de un reactivo de acoplamiento tal como diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-hidrox-1*H*-benzotriazol (HOBt), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), o hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1, 2, 3-triazolo[4, 5-*b*]piridinio (HATU). En otra modalidad, las condiciones de reacción son las condiciones de formación de amina convencionales. En una modalidad, las condiciones de formación de amina son las condiciones de aminación reductora.

6. Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes dan a conocer las preparaciones y los ensayos de los análogos de péptidos de conotoxina de RgIA y de los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados de RgIA.

Se debe entender que los siguientes ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

6.1. **Ejemplo 1: Mezcla en disulfuro de los análogos de péptidos de conotoxina de RgIA CSP-4-OH y CSP-4-NH₂**

Los análogos de péptidos de conotoxina de RgIA CSP-4-OH y CSP-4-NH₂ tienen una secuencia de aminoácidos de Gly-Cys-Cys-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-(Cit)-(3-yodo-Tyr) Gln-Cys-Tyr; en donde CSP-4-OH (SEQ ID NO: 4) tiene un grupo de ácido carboxílico en el término C, y CSP-4-NH₂ tiene un grupo amida en el término C. CSP-4-desTyr-OH tiene una secuencia de aminoácidos de Gly-Cys-Cys-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-(Cit)-(3-yodo-Tyr) -Gln-Cys (SEQ ID NO: 5), con un ácido carboxílico en el término C.

Cuando se incubaron en plasma y suero humano y de rata, se encontró que los análogos de péptidos de conotoxina CSP-4-OH y CSP-4-NH₂ eran susceptibles a la mezcla en disulfuro. Esta reordenación de disulfuro dio como resultado la formación de isómeros de los derivados de RgIA que perdieron su actividad en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$.

La conformación activa de CSP-4-NH₂ consiste en dos enlaces de disulfuro, uno entre Cys2 y Cys8, y un segundo enlace entre Cys3 y Cys12. La forma “nativa” de Cys2-8, Cys3-12 del CSP-4-NH₂ está activa tanto en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano como en el de la rata. Después de la exposición al suero o plasma humano y de rata, una porción significativa de la forma nativa del CSP-4-NH₂ experimentó una isomerización en una forma de “cinta”, que contenía enlaces de disulfuro alternativos de Cys2-Cys12 y Cys3-Cys8 y una forma de “esfera” que contenía enlaces de disulfuro alternativos de Cys2-Cys3 y Cys8-Cys12.

En las muestras de plasma y suero, el CSP-4-NH₂ se isomerizó principalmente entre las formas nativas y de cinta, con muy poca formación de esferas (figuras 1A y 1B). Ni la forma de cinta ni de esfera fueron activas en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano o de rata, lo que sugiere que la mezcla en disulfuro contribuye a una reducción en la potencia de la molécula. Además, la presencia de una amida C-terminal en el CSP-4-NH₂ no redujo la isomerización con respecto a un ácido carboxílico C-terminal en el CSP-4-OH. Por último, la isomerización con disulfuro también se presentó *in vivo* después de la inyección intravenosa y subcutánea de una dosis de 1 mg por kg del compuesto 6 a las ratas Sprague Dawley. En 1 h después de

la inyección, sólo del 40 % al 50 % del péptido recuperado de la sangre se mantuvo en la forma nativa de acuerdo con el análisis de HPLC-MS/MS, lo que indica que la isomerización con disulfuro se produce *in vivo* de una forma similar a las observaciones *in vitro*.

La mezcla en disulfuro de los análogos de péptidos de conotoxina CSP-4-OH y CSP-4-NH₂ se demostró por medio de la incubación de los péptidos en una concentración final de 0.1 a 0.5 mg por mL en el suero o el plasma de la rata Sprague Dawley y de humano *in vitro* a 37 °C hasta 24 h. Las muestras de plasma se trataron con anticoagulantes, los cuales incluyeron citrato, K₂ EDTA y heparina. Las muestras de las incubaciones fueron retiradas en varios puntos del tiempo y para cada punto del tiempo, los isómeros de péptidos resultantes se extrajeron a partir de la matriz por medio de la precipitación de proteínas (3 volúmenes de metanol) seguida de una centrifugación de la muestra precipitada a 10,000 xg a través de un filtro centrífugo Millipore Ultrafree-MC GV. La muestra clarificada resultante se recuperó, y se inyectaron 5 µL en una Agilent 1260 Infinity HPLC equipada con una columna Phenomenex Aeris C-18 (2.1 x 150 mm, 3.6 µm). Los péptidos se separaron por medio de una elución en gradiente a 0.3 mL por min con el 0 % al 50 % de B durante 45 min; fase móvil A (19: 1: 0.01 H₂O/CH₃ CN/TFA), y fase móvil B (CH₃ CN con TFA al 0.05 %). En estas condiciones, el tiempo de retención relativo de los diversos isómeros de CSP-4-NH₂ fue el siguiente: cinta < esfera < nativo (figura 1B).

El tratamiento del CSP-4-NH₂ (40 µg por mL) con una mezcla de 1: 1 de glutatona oxidada y glutatona reducida (10 mM de cada una) durante 1 h, seguido del tratamiento (apagado) con ácido fórmico al 8 %, dio como resultado la formación del isómero de cinta con la misma masa y tiempo de retención en cromatografía que el producto observado en el suero o plasma, lo que indica que la isomerización en disulfuro medió la inestabilidad del péptido en las matrices biológicas (figura 1D). La reducción de glutatona dio como resultado una mezcla de la forma nativa y de cinta.

Después de la resolución, la recolección y la liofilización de cada pico de HPLC como anteriormente, se determinó la identidad de cada isómero de CSP-4-OH y CSP-4-NH₂ a través del uso del análisis de LC-MS en un Orbitrap Elite (figura 1C). Las alícuotas de la muestra no reducida se diluyeron a 1: 100 en agua: acetonitrilo: ácido fórmico (98: 2: 0.1 %) hasta una concentración estimada de 1.2 a 1.5 pmol por µL. Se hizo una inyección de 10 µL por medio de un sistema Easy-nLC II HPLC (Thermo Scientific) en una nano-columna de sílice fusionada de 75 µm de diámetro interno, PicoTip^{MR} de 25 cm de largo (New Objective) acoplada a una trampa de 2 cm de largo y 100 µm de diámetro interno, IntegraFrit^{MR} (New Objective). La columna y la trampa se configuraron en una configuración de ventilación (Licklider, *et al.*, Analytical Chemistry, 2002, 74, 3076-3082), con la columna empaquetada con un medio de fase inversa Magic C18 AQ de un tamaño de 5 µm (tamaño de poros de 100 Å, Michrom Bioresources, Auburn, CA) y la trampa empaquetada con el mismo material (tamaño de poros de 200 Å, Michrom). Las muestras se resolvieron en la columna a través del uso de un gradiente consistente en la fase móvil A [agua de grado ultrapura/ ácido fórmico (0.1 % en volumen)] y la fase móvil B [acetonitrilo/ ácido fórmico (0.1 % en volumen)] a una velocidad de flujo de 400 nL por min de acuerdo con lo siguiente: a partir del 95 % de "A" y el 5 % de "B", de 0 a 2 minutos en donde la fase móvil "B" se aumenta gradualmente desde el 5 % hasta el 7 %, seguido por un aumento desde el 7 % de "B" hasta el 35 % de "B" durante 60 minutos, seguido por un aumento

desde el 35 % de “B” hasta el 50 % de “B” durante 2 minutos, en donde la “B” se mantiene durante 1 minuto, seguido por un aumento desde el 50 % de “B” hasta el 90 % de “B” durante 5 minutos y se mantuvo durante 8 minutos, y por último seguido de un período en donde la “B” se disminuye de regreso hasta el 5 % durante 1 minuto para la re-equilibración hasta las condiciones de partida. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo dependiente de los datos a través de la gama de 400 a 1800 m/z. Para cada ciclo del instrumento, los 3 primeros iones más abundantes se seleccionaron a partir de una exploración precursora (con la resolución del orbitrap ajustada a 120 k en el modo de perfil). Los datos de MS/MS se recolectaron en el modo centroide a través del uso de los mismos ajustes que se enlistan anteriormente, con la excepción de que la anchura del aislamiento se fijó a 2.0 m/z. La configuración de exclusión dinámica utilizada fue como sigue: cuenta de repetición de 1, una duración de cuenta de 15 segundos, un tamaño de lista de exclusión de 500 y una duración de exclusión de 30 segundos. Los isómeros nativos y de cinta tuvieron la misma proporción de la masa a la carga como se determinó a través del uso de la espectrometría de masas, lo que indica que los dos picos de HPLC tienen la misma identidad (figura 1C).

Se encontró que el isómero de cinta aislado CSP-4-NH₂ no tenía ninguna actividad de bloqueo sobre el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. El CSP-4-NH₂ se incubó en suero humano durante una hora como se ha descrito anteriormente, seguido de la HPLC de preparación y la recolección del pico correspondiente al isómero de cinta. El isómero de cinta también se sintetizó químicamente con la conectividad de disulfuro de Cys2-Cys12 y Cys3-Cys8. El isómero de cinta químicamente sintetizado y el isómero aislado en seguida de la incubación en el suero humano se ensayaron para determinar su actividad en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano a través del uso de la electrofisiología de sujeción de voltaje de dos electrodos.

Se midió la capacidad de cada análogo para bloquear las corrientes de nAChR $\alpha 9\alpha 10$ inducido por la acetilcolina en los ovocitos de *Xenopus*. Como se muestra en la tabla 1, el CSP-4-NH₂ nativo en una concentración de 100 nM bloqueó > 99 % de las corrientes evocadas por ACh, mientras que tanto los isómeros de cinta químicamente sintetizados como los derivados del suero del CSP-4-NH₂ fueron inactivos en concentraciones de 0.1 a 10 μ M. Como se muestra en las figuras 1A y 1B, en las muestras de plasma y suero, el análogo de péptido de conotoxina CSP-4-NH₂ se isomerizó entre las formas nativas y de cinta, con muy poca formación de esferas.

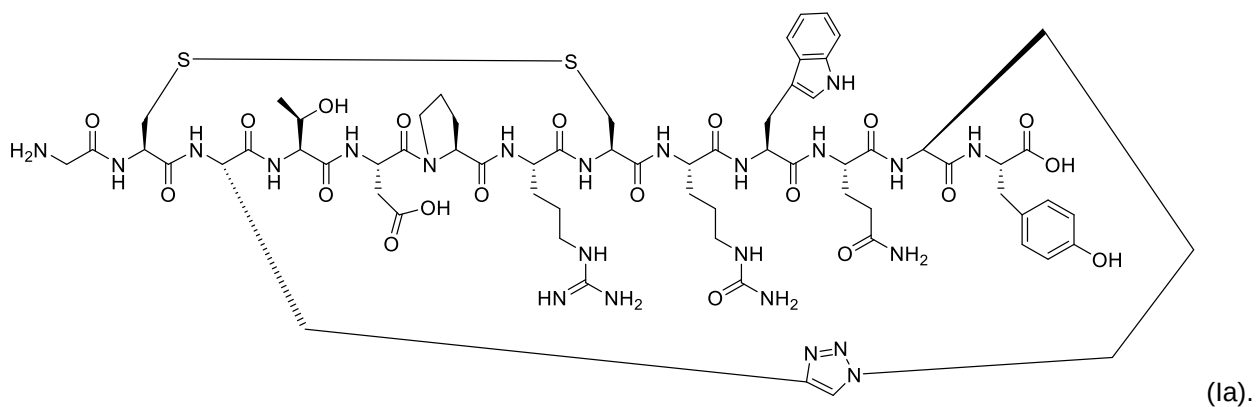
La actividad reducida de la forma de cinta sobre el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano o de rata sugirió que la mezcla con disulfuro contribuye a una reducción en la potencia de la molécula. Además, la presencia de una amida C-terminal en el CSP-4-NH₂ no redujo la isomerización con respecto a un ácido carboxílico C-terminal en el CSP-4-OH. Por último, la isomerización con disulfuro también se presentó *in vivo* después de la inyección intravenosa y subcutánea de una dosis de 1 mg por kg del CSP-4-OH a las ratas Sprague Dawley. En 1 h después de la inyección, sólo del 40 % al 50 % del péptido recuperado de la sangre se mantuvo en la forma nativa de acuerdo con el análisis de HPLC-MS/MS, lo que indica que la isomerización con disulfuro se produce *in vivo* de una forma similar a las observaciones *in vitro*.

Tabla 1: Actividad de isómeros nativos y de cinta del CSP-4-NH2 sobre el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano expresada en ovocitos de *Xenopus* (Porcentaje de corriente inducida por acetilcolina 100 μM restante en la presencia del compuesto en comparación con la respuesta de control en ausencia del compuesto)

nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humanos					
	Número de ovocitos				
Compuesto (μM)	1	2	3	4	Promedio $\pm$ SEM
CSP-4-NH2 nativo 0.1 μM	0.4	0.21	0.59		0.4 ± 0.11
CSP-4-NH2 de cinta sintético 0.1 μM	112.25	102.48			107.4 ± 4.9
CSP-4-NH2 de cinta sintético 10 μM	95	102.48	84.56	105.07	96.8 ± 4.6
CSP-4-NH2 de cinta aislado del suero 1 μM	130.35	98.77	101.21		110.1 ± 10.1

6.2. Ejemplo 1: Preparación de análogos de péptidos de conotoxina

Ejemplo 1.1 Análogo de péptido de conotoxina 1a (L-tirosina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵- (1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 6):



Resina de 2-clorotritilo cargada con Fmoc-Tyr (OtBu)-OH (1): Se añadió una resina de cloruro de 2-clorotritilo (MFCD00040399, 15.0 g, 18 mmol) a un recipiente de reacción y se lavó con CH₂Cl₂ (100 mL) y después se hinchó en CH₂Cl₂ (100 mL) durante 10 min. Después de drenar el recipiente de reacción, se añadió una solución de Fmoc-Tyr (OtBu) -OH (2.5 g, 5.4 mmol) en CH₂Cl₂ (150 mL), seguida de la adición por goteo de DIPEA (1.8 mL, 10.8 mmol). A continuación el recipiente de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. El disolvente se drenó de la resina, la cual se lavó posteriormente con DMF (6 x 100 mL), seguida de MeOH (2 x 100 mL) y por último Et₂O (2 x 100 mL). La resina se secó al vacío durante 2 h y la prueba de carga de Fmoc indicó que la carga de péptido fue de 0.29 mmol por g.

Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, por sus siglas en inglés) de la secuencia de péptido de Fmoc-Gly-Cys(Trt)-Pra-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Arg(Pbf)-Cys(Trt)-Cit-Trp(Boc)-Gln(Trt)-5-azido-NVa-Tyr(tBu)-O-(2-clorotritilo) sobre un soporte de poliestireno (2): La resina de 2-clorotritilo cargada con el Fmoc-Tyr(OtBu) (1, 17.3 g, 5 mmol) se lavó con DMF (100 mL) y después se drenó por completo. El grupo Fmoc se retiró del grupo Tyr atado por medio de su tratamiento con 1: 4 de piperidina/ DMF (2 x 100 mL, 15 min cada una), y después la resina se lavó con DMF (6 x 100 mL). Entonces, se añadieron HATU (3.80 g, 10 mmol), HOAt (1.35 g, 10 mmol), y DIPEA (2.5 mL, 15 mmol) con Fmoc-5-azido-NVa-OH (CAS # 1097192-04-5, 3.80 g, 10 mmol) en DMF (100 mL). El recipiente de reacción se agitó durante un mínimo de 2.5 h, seguido de un lavado con DMF (6 x 100 mL). La integridad de la reacción se determinó por medio del ensayo de la ninhidrina. Si fue negativo (incoloro), el acoplamiento se consideró completo y se continuó la síntesis. Si fue positivo (azul), se acopló un segundo equivalente de la misma Fmoc-aminoácido (10 mmol) en DMF (100 mL) a través del uso de la resina y HATU/HOAt (10 mmol/10 mmol) tal y como se describe anteriormente. Una vez que la prueba de la ninhidrina indicó que la reacción estaba completa, se eliminó el Fmoc de cada uno de los aminoácidos que se añadieron en secuencia, seguido del acoplamiento del siguiente Fmoc-aminoácido-OH en la secuencia peptídica tal y como se describe anteriormente. Esto se llevó a cabo sucesivamente en el siguiente orden con Fmoc-Gln(Trt)-OH (CAS # 132327-80-1, 6.1 g, 10 mmol), Fmoc-Trp(Boc)-OH (CAS # 143824-78-6, 5.2 g, 10 mmol), Fmoc-Cit-OH (CAS # 133174-15-9, 3.9 g, 10 mmol), Fmoc-Cys(Trt)-OH (CAS # 103213-32-7, 5.8 g, 10 mmol), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (CAS # 154445-77-9, 6.4 g, 10 mmol), Fmoc-Pro-OH (CAS # 71989-31-6, 3.3 g, 10 mmol), Fmoc-Asp(OtBu)-OH (CAS # 71989-14-5, 4.1 g, 10 mmol), Fmoc-Thr(tBu)-OH (CAS # 71989-35-0, 3.9 g, 10 mmol), Fmoc-Pra-OH (CAS # 198561-07-8, 3.3 g, 10 mmol), Fmoc-Cys(Trt)-OH (5.8 g, 10 mmol), y Fmoc-Gly-OH (CAS # 29022-11-5, 2.9 g, 10 mmol). Después de que se completaron los acoplamientos de los péptidos lineales, la resina se lavó con DMF (100 mL x 6), seguida de MeOH (100 mL x 2) y por último Et₂O (100 mL x 2) y, a continuación, se secó al vacío durante 2 h.

Disociación de la resina de la secuencia de aminoácidos de H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-Tyr-OH (3) (SEQ ID NO: 7): A la resina seca (2, 28.0 g, 5.0 mmol) en un matraz se le añadieron 230 mL de una solución de disociación (TFA/EDT/tioanisol/anisol: 90: 3: 5: 2) y la

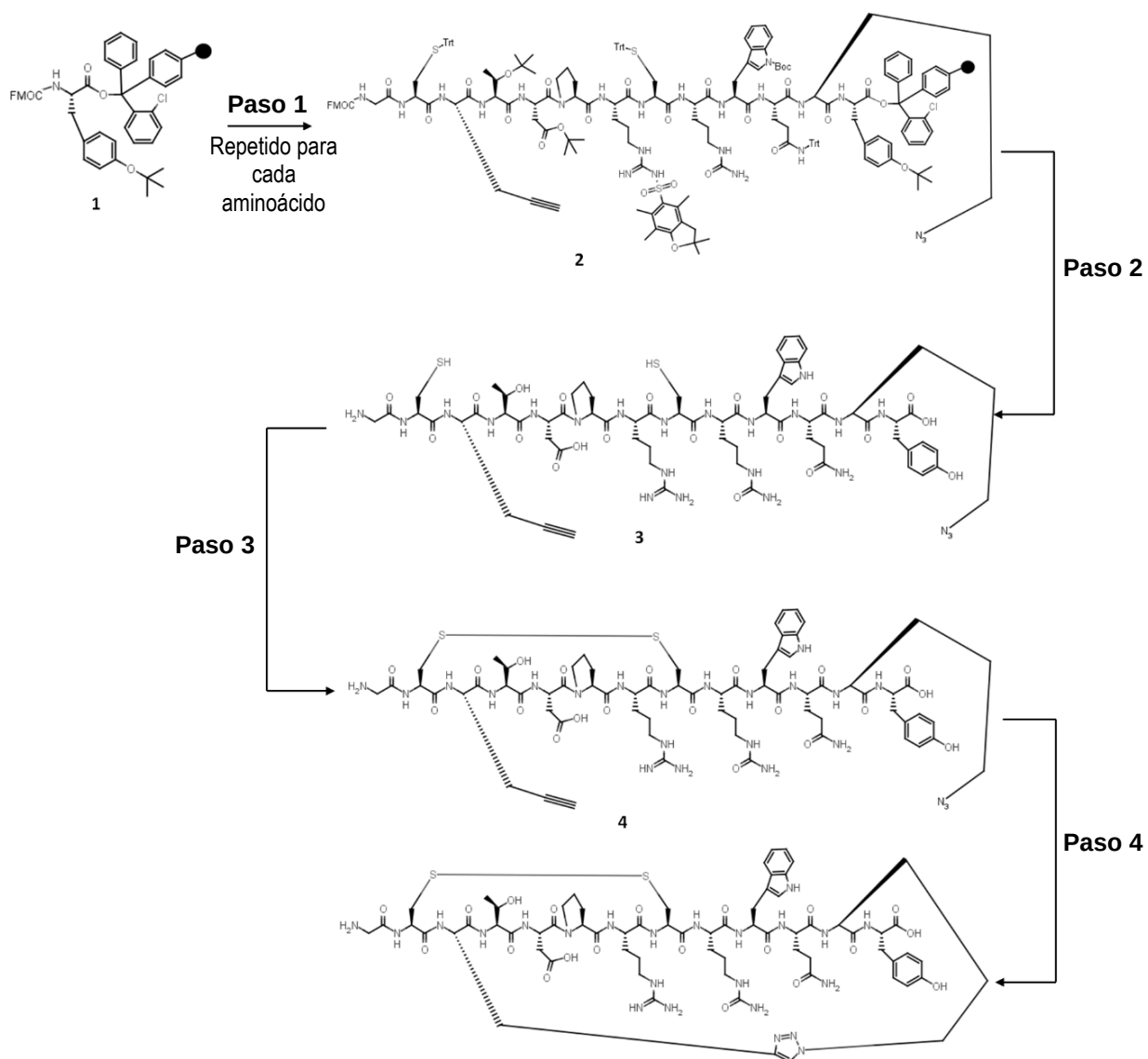
mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la resina se filtró y se lavó con TFA (2 x 50 mL). Los filtrados se combinaron, y se añadió 10 veces el volumen de Et₂O frío (0 °C), lo que dio como resultado la precipitación del péptido. El péptido precipitado se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y se lavó con Et₂O frío (0 °C) (3 x 50 mL). El producto crudo se secó al vacío durante 2 h para obtener el **3** (6.8 g, 4.2 mmol, 84 %), el cual se usó sin purificación adicional para el siguiente paso.

Formación de puente de disulfuro de cisteína para producir el H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-Tyr-OH, (Cys2 → Cys8) puente de disulfuro (4) (SEQ ID NO: 8): El péptido **3** (2.0 g, 1.2 mmol) se disolvió en CH₃ CN (100 mL), DMSO (100 mL) y H₂O (1800 mL). Entonces se añadió por goteo H₂O₂ (al 30 % en H₂O, 0.25 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. Después de este tiempo, la mezcla se filtró, y el filtrado se purificó por medio de una HPLC Método J, para proporcionar 800 mg del compuesto del título **4** como un sólido blanco (rendimiento: 38 %, sal de TFA). LC-MS (ESI) m/z: 540.7 [M + 3H] / 3⁺, 810.3 [M + 2H] / 2⁺, Pureza del 95 % (214 nm). Los 4.8 g restantes del **3** se distribuyeron en dos lotes, y se oxidaron y se purificaron como se ha descrito para obtener un total de 2.5 g del **4** (rendimiento global: 35 %).

Ciclación 1, 3-dipolar / reacción de clic (formación de puente de triazol) para producir el análogo de péptido de conotoxina Ia: El péptido **4** (400 mg, 0.25 mmol) se disolvió en iPrOH (100 mL) y H₂O (300 mL). Luego se añadió una solución de CuSO₄ (157 mg, 1 mmol) en H₂O (2 mL), seguida de la adición por goteo de L-ácido ascórbico (176 mg, 1 mmol) en H₂O (2 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después, la solución se cargó directamente en una columna de evaporación instantánea (por ejemplo, Biotage® SNAP Ultra C18, 120 g) y se eluyó con agua (TFA al 0.1 %) y CH₃CN. Las fracciones del eluato que contenían el análogo de péptido de conotoxina **Ia** se combinaron y se liofilizaron para obtener 305 mg de la sal de TFA del análogo de péptido de conotoxina **Ia** como un sólido blanco (305 mg, sal de TFA, rendimiento: 69 %). LC-MS (ESI) m/z: 540.7 [M + 3H] / 3⁺, 810.3 [M + 2H] / 2⁺, Pureza del 90 % (214 nm). Los 2.1 g restantes del **4** se distribuyeron en tres lotes y cada uno se trató con las condiciones que se describen anteriormente, para proporcionar 1.7 g del análogo de péptido de conotoxina **Ia** del título (rendimiento combinado general: 61 %, sal de TFA).

La sal de TFA del análogo de péptido de conotoxina **Ia** obtenida (1.0 g) se disolvió en H₂O (20 mL) y CH₃CN (2 mL). A continuación, se añadió por goteo una solución 20 mM de NH₄HCO₃ (ac.) para ajustar el pH de 7.0 a 8.0. Después, la mezcla se purificó a través del uso de HPLC método H. Las fracciones que contenían el producto se liofilizaron para dar la sal de acetato del análogo de péptido de conotoxina **Ia** como un sólido blanco (650 mg, sal de acetato, rendimiento global: 62 %). Los 700 mg restantes del análogo de péptido de conotoxina **Ia** - sal de TFA, se purificaron y se convirtieron en la sal de acetato de la misma manera para dar 350 mg (48 %, sal de acetato). La cantidad total combinada obtenida fue de 1.0 g de la sal de acetato del análogo de péptido de conotoxina **Ia** (56 %). LC-MS (ESI-TOF) m/z: 540.2 [M + 3H]/3⁺, 810.0 [M + 2H]/2⁺, 1617.66 [M + H]⁺; HPLC método A; tiempo de retención: 10.1 min; pureza del 95.7 %.

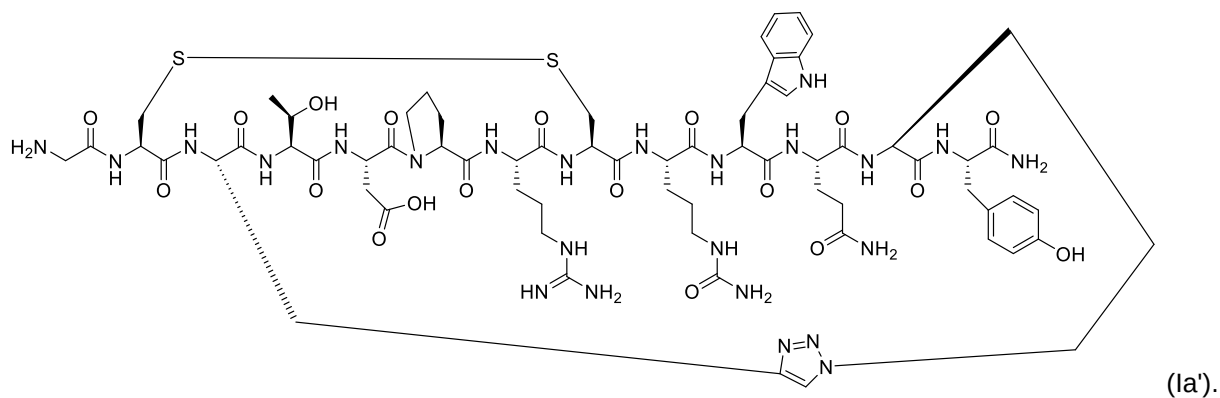
La síntesis del análogo de péptido de conotoxina **1a** se ilustra en el esquema 1:



Ejemplo 1.2

Análogo de péptido de conotoxina **1a'** (L-tirosinamida, glicil-L-cisteinil-L-alanil-

L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5- (aminocarbonil) -L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8) -disulfuro-cíclico 3³, 12⁵ - (1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 9):

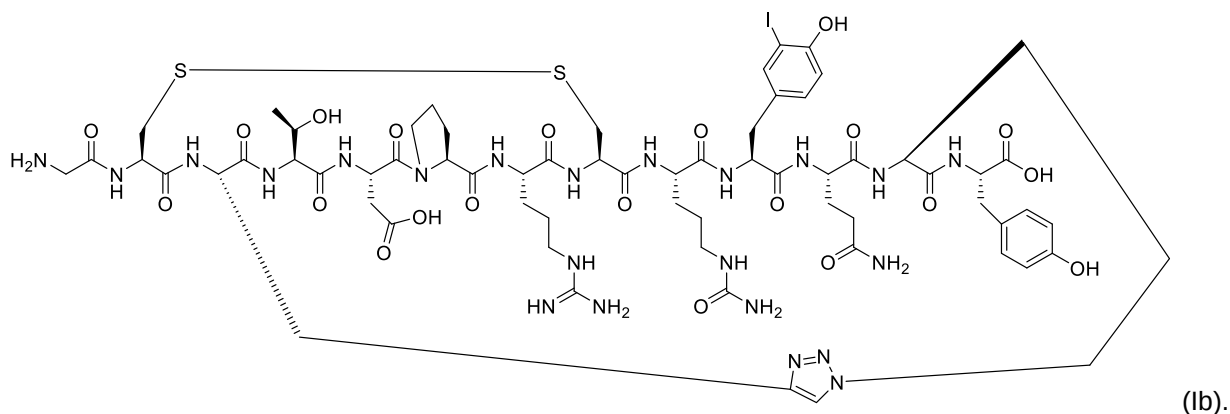


Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ya'** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNva-Tyr-NH₂**) (SEQ ID NO: 10): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ya'** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de una resina Rink Amida MFCD00677976 en lugar de la resina de cloruro de 2-clorotritilo MFCD00040399.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Za'** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNva-Tyr-NH₂**, (**Cys2** → **Cys8**) **punto de disulfuro**) (SEQ ID NO: 11): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Za'** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ya'** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **la'** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **la'** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Za'** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 1617.5 (M + 1H)⁺ (MW calculado: 1616.5); HPLC método E; tiempo de retención: 14.0 min; pureza del 96.9 %.

Ejemplo 1.3 Análogo de péptido de conotoxina lb (L-tirosina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5- (aminocarbonil) -L-ornitil-L-3 -yodotirosil-L-glutaminil-L-norvalil-cíclico (2 → 8) -disulfuro-cíclico 3³, 12⁵ - (1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 12):



Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-3-I-Tyr-Gln-5-azidoNva-Tyr-OH**) (SEQ ID NO: 13): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de FMOC-3-I-Tyr-OH en lugar de FMOC-Trp (Boc) -OH en la síntesis del péptido del residuo en la posición 10.

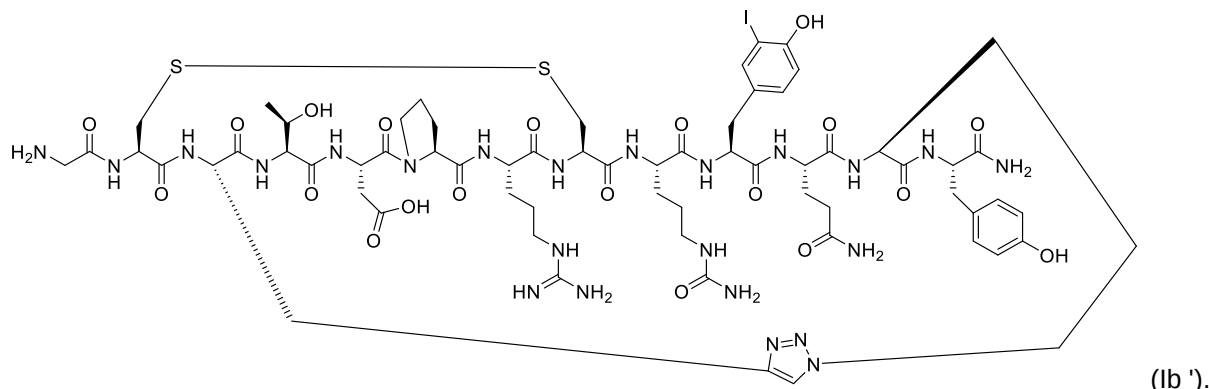
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-3-I-Tyr-Gln-5-azidoNva-Tyr-OH**, (**Cys2** → **Cys8**) **punto de disulfuro**) (SEQ ID NO: 14): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **lb** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **la** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI-TOF) m/z: 574.7 [M + 3H]⁺ / 3⁺, 861.5 [M + 2H]⁺ / 2⁺

(MW calculado: 1720.54); HPLC método C; tiempo de retención: 11.7 min; pureza del 94.8 %.

Ejemplo 1.4a Análogo de péptido de conotoxina Ib' (L-tirosinamida, glicil-L-cisteinil-L-alanil-

L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5- (aminocarbonil) -L-ornitil-L-3 -yodotirosil-L-glutaminil-L-norvalil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8) -disulfuro-cíclico 3³, 12⁵ - (1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo) (SEQ ID NO: 15):



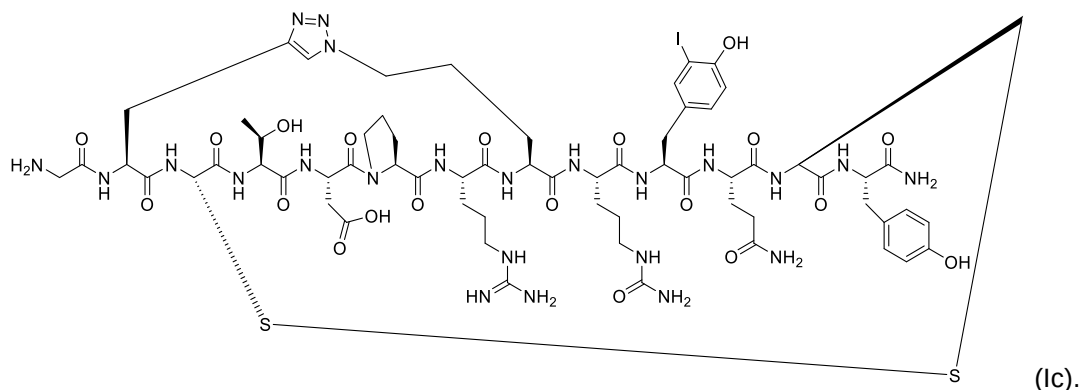
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-3-I-Tyr-Gln-5-azidoNva-Tyr-NH2**) (SEQ ID NO: 16): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb** a través del uso de una resina Rink Amida MFCD00677976 en lugar de la resina de cloruro de 2-clorotritilo MFCD00040399 en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-3-I-Tyr-Gln-5-azidoNva-Tyr-NH2**, (Cys2 $\rightarrow$ Cys8) puente de disulfuro) (SEQ ID NO: 17): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **Ib'** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI-TOF) m/z: 574.2 [M + 3H] / 3⁺, 860.8 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1719.55); HPLC método B; tiempo de retención: 10.5 min; pureza del 93.8 %.

Ejemplo 1.4b Análogo de péptido de conotoxina Ic (L-tirosinamida, glicil-L-alanil-L-cisteinil-

L-treonil-L- α aspartil-L-prolil-L-arginil-L-norvalil-N5- (aminocarbonil) -L-ornitil-L-3 -yodotirosil-L-glutaminil-L-cisteinil-cíclico 2³, 8⁵ - (1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo) cíclico - (3 $\rightarrow$ 12) disulfuro) (SEQ ID NO: 18):

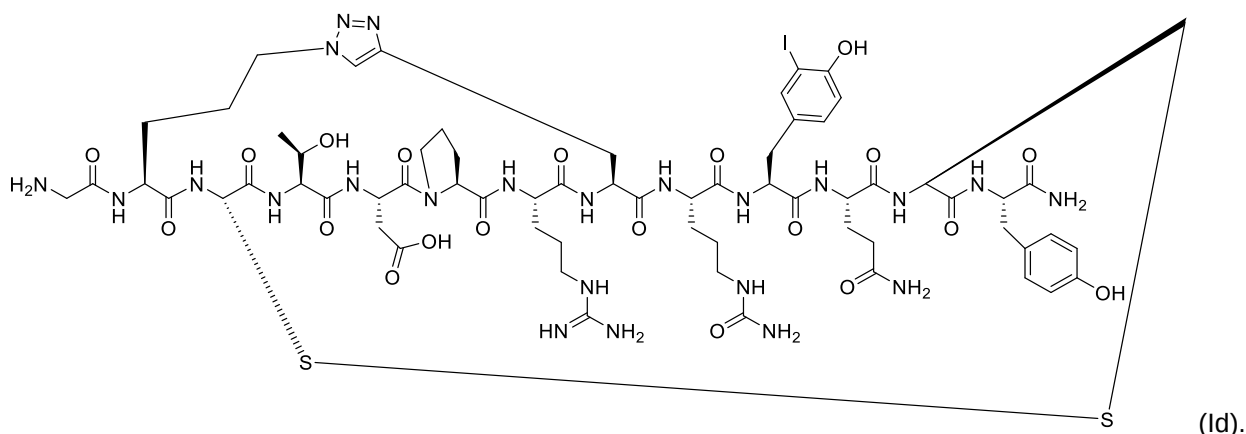


Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yc** (**H-Gly-Pra-Cys-Thr-Asp-Pro-Arg-5-azidoNVal-Cit-3-I-Tyr-Gln-Cys-Tyr-NH₂**) (SEQ ID NO: 19): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yc** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'** a través del uso de FMOC-Cys (Trt) -OH en lugar de FMOC-5-azido-NVa-OH (el residuo en la posición 12), FMOC-5-azido-NVa-OH en lugar de FMOC-Cys (Trt) -OH (el residuo en la posición 8), FMOC-Cys (Trt) -OH en lugar de FMOC-Pra-OH (el residuo en la posición 3), y FMOC-Pra-OH en lugar de FMOC-Cys (Trt) -OH (el residuo en la posición 2) en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zc** (**H-Gly-Pra-Cys-Thr-Asp-Pro-Arg-5-azidoNVal-Cit-3-I-Tyr-Gln-Cys-Tyr-NH₂**, (**Cys3** → **Cys12**) **punto de disulfuro**) (SEQ ID NO: 20): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zc** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yc** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **lc** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **lb'** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zc** en lugar del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'**. LC-MS (ESI-TOF) m/z: 574.2 [M + 3H] / 3⁺, 860.7 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1719.55); HPLC método B; tiempo de retención: 10.2 min; pureza del 98.3 %.

Ejemplo 1.5 Análogo de péptido de conotoxina Id (L-tirosinamida, glicil-L-norvalil-L-cisteinil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-alanil-N5- (aminocarbonil) -L-ornitil-L-3 -yodotirosil-L-glutaminil-L-cisteinil-cíclico 2⁵, 8³ - (1H-1, 2, 3-triazol-1, 4-diilo) cíclico - (3 → 12) disulfuro) (SEQ ID NO: 21):



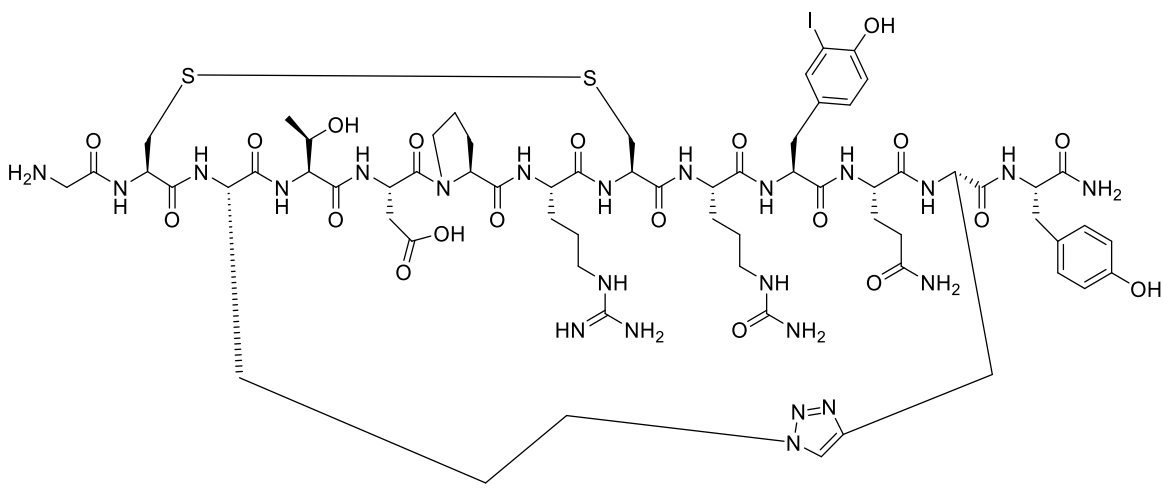
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yd** (**H-Gly-5-azidoNVal-Cys-Thr-Asp-Pro-Arg-Pra-Cit-3-I-Tyr-Gln-Cys-Tyr-NH₂**) (SEQ ID NO: 22): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yd** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'** a través del uso de FMOC-Cys (Trt) -OH en lugar de FMOC-5-azido-NVa-OH (el residuo en la posición 12), FMOC-Pra-OH en lugar de FMOC-Cys (Trt) -OH (el residuo en la posición 8), FMOC-

Cys (Trt) -OH en lugar de Fmoc-Pra-OH (el residuo en la posición 3), y Fmoc-5-azido-NVa-OH en lugar de Fmoc-Cys (Trt) -OH (el residuo en la posición 2) en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zd** (**H-Gly-5-azidoNVa-Cys-Thr-Asp-Pro-Arg-Pra-Cit-3-I-Tyr-Gln-Cys-Tyr-NH₂**, (Cys3 → Cys12) puente de disulfuro) (SEQ ID NO: 23): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zd** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yd** en lugar del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'**.

El análogo de péptido de conotoxina **Id** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ib'** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zd** en lugar del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'**. LC-MS (ESI-TOF) m/z: 860.7 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1719.55); HPLC método B; tiempo de retención: 10.2 min; pureza del 99.2 %.

Ejemplo 1.6 Análogo de péptido de conotoxina Ie (L-tirosinamida, glicil-L-cisteinil-L-norvalil-L-treonil-L-α-aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5- (aminocarbonil) -L-ornitil-L-3 -yodotirosil-L-glutaminil-L-alanil-cíclico (2 → 8) -disulfuro-cíclico 3⁵, 12³ - (1H-1, 2, 3-triazol-1, 4-diilo)) (SEQ ID NO: 24):



Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ye** (**H-Gly-Cys-5-azidoNVa-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-3-I-Tyr-Gln-Pra-Tyr-NH₂**) (SEQ ID NO: 25): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ye** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'** a través del uso de Fmoc-Pra-OH en lugar de Fmoc-5-azido-NVa-OH (el residuo en la posición 12) y Fmoc-5-azido-NVa-OH en lugar de Fmoc-Pra-OH (el residuo en la posición 3) en la síntesis de péptidos en fase sólida.

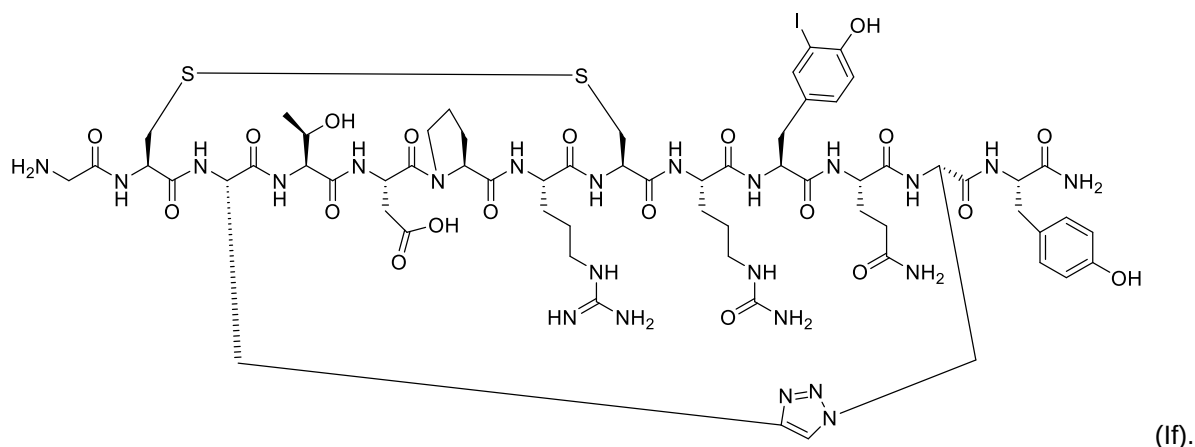
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ze** (**H-Gly-Cys-5-azidoNVa-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-3-I-Tyr-Gln-Pra-Tyr-NH₂**, (Cys2 → Cys8) puente de disulfuro) (SEQ ID NO: 26): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ze** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'** a través del uso del análogo de péptido de

conotoxina intermediario **Ye** en lugar del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'**.

El análogo de péptido de conotoxina **le** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **lb'** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ze** en lugar del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'**. LC-MS (ESI-TOF) m/z: 574.4 [M + 3H] / 3⁺, 861.1 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1719.55); HPLC método C; tiempo de retención: 12.6 min; pureza del 92.1 %.

Ejemplo 1.7

Análogo de péptido de conotoxina If (L-tirosinamida, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5- (aminocarbonil) -L-ornitil-L-3 -yodotirosil-L-glutaminil-L-alanil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8) -disulfuro-cíclico 3³, 12³ - (1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 27):



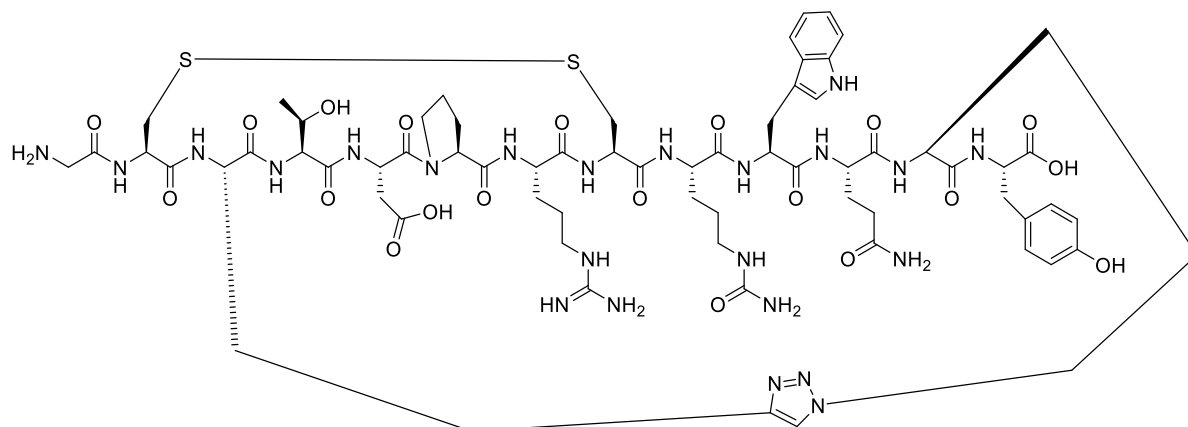
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yf** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-3-I-Tyr-Gln-3-azidoAla-Tyr-NH2**) (SEQ ID NO: 28): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yf** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'** a través del uso de Fmoc-3-azido-Ala-OH en lugar de Fmoc-Pra-OH (el residuo en la posición 12) y Fmoc-Pra-OH en lugar de Fmoc-5-azido-NVa-OH (el residuo en la posición 3) en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zf** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-3-I-Tyr-Gln-3-azidoAla-Tyr-NH2, (Cys2 $\rightarrow$ Cys8) puente de disulfuro**) (SEQ ID NO: 29): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zf** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yf** en lugar del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yb'**.

El análogo de péptido de conotoxina **If** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **lb'** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zf** en lugar del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zb'**. LC-MS (ESI-TOF) m/z: 847.1 [M + 2H] / 2⁺; 1693.1 [M + 1H] / ⁺ (MW calculado: 1691.52); HPLC método E; tiempo de retención: 12.3 min; pureza del 94.6 %.

Ejemplo 1.8

Análogo de péptido de conotoxina Ig (L-tirosina, glicil-L-cisteinil-(2S)-2-aminobutanoil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico 3⁴,12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 30):



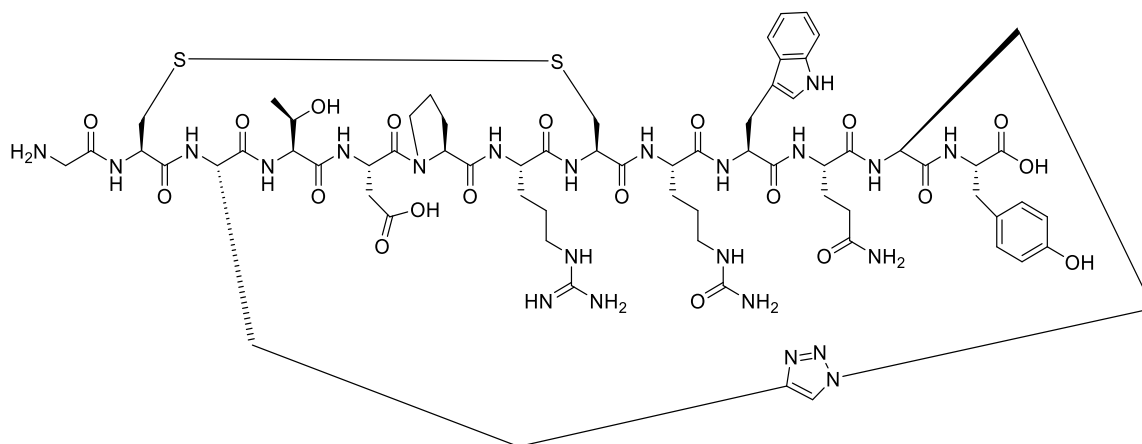
(Ig).

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yg** (**H-Gly-Cys-homoPra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-Tyr-OH**) (ID SEQ NO: 31): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yg** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de Fmoc-homopropargil glicina en lugar de Fmoc-Pra-OH (el residuo en la posición 3) en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zg** (**H-Gly-Cys-homoPra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-Tyr-OH, (Cys2 → Cys8) puente de disulfuro**) (SEQ ID NO: 32): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zg** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yg** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **Ig** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zg** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z : 545.0 $[M + 3H]^+ / 3^+$, 817.3 $[M + 2H]^+ / 2^+$ (MW calculado: 1631.67); HPLC método A; tiempo de retención: 12.5 min; pureza del 98.2 %.

Ejemplo 1.9 Análogo de péptido de conotoxina Ih (L-tirosina, glicil-L-cisteinil-(2S)-2-aminobutanoil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-(2S)-2-aminobutanoil-cíclico (2 → 8)-disulfuro-cíclico ^{34,124}-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 33):



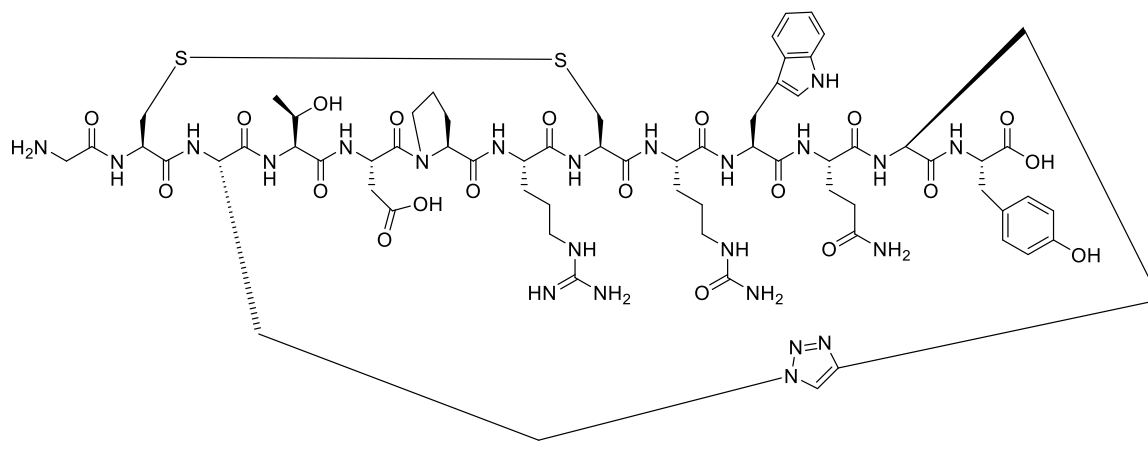
(Ih).

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yh** (**H-Gly-Cys-homoPra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-azidohomoAla-Tyr-OH**) (ID SEQ NO: 34): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yh** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de Fmoc-homopropargil glicina en lugar de Fmoc-Pra-OH (el residuo en la posición 3) y Fmoc-γ-azido-homoalanina en lugar de Fmoc-5-azido-NVA-OH (el residuo en la posición 12) en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zh** (**H-Gly-Cys-homoPra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-azidohomoAla-Tyr-OH**, (**Cys2** → **Cys8**) **punto de disulfuro**) (SEQ ID NO: 35): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zh** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yh** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **lh** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **la** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zh** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z : 540.6 $[M + 3H]^+ / 3^+$, 809.9 $[M + 2H]^+ / 2^+$ (MW calculado: 1617.66); HPLC método A; tiempo de retención: 12.4 min; pureza del 83.9 %.

Ejemplo 1.10 Análogo de péptido de conotoxina li (L-tirosina, glicil-L-cisteinil-(2S)-2-aminobutanoil-L-treonil-L-α-aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-(2S)-2-aminobutanoil-cíclico (2 → 8)-disulfuro-cíclico 3^4 , 12^4 -(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 36):



Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yi** (**H-Gly-Cys-azidohomoAla-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-homoPra-Tyr-OH**) (ID SEQ NO: 37): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yi** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de Fmoc-γ-azido-homoalanina en lugar de Fmoc-Pra-OH (el residuo en la posición 3) y Fmoc-homopropargil glicina en lugar de Fmoc-5-azido-NVA-OH (el residuo en la posición 12) en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zi** (**H-Gly-Cys-azidohomoAla-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-homoPra-Tyr-OH**, (**Cys2** → **Cys8**) **punto de disulfuro**) (SEQ ID NO: 38): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zi** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe

10

15

20

NC(=O)C[C@@H](CS1CCCCC1S2CCCCC2)C(=O)N[C@@H](C(=O)O)C(=O)N[C@@H](C[C@H](O)C)C(=O)N[C@@H](C(=O)O)C(=O)N[C@@H](C1CC2CC3CC1CC2CC3)C(=O)N[C@@H](CCCNC(=N)N)C(=O)N[C@@H](C(=O)O)C(=O)N[C@@H](CCCNC(=O)N)C(=O)N[C@@H](C[C@@H](c1c[nH]c2ccccc12)C)C(=O)N[C@@H](CCCNC(=O)N)C(=O)N[C@@H](CCCNC(=O)N)C(=O)N[C@@H](C[C@@H](C(=O)O)C)C(=O)N[C@@H](Cc1ccc(O)cc1)C(=O)O

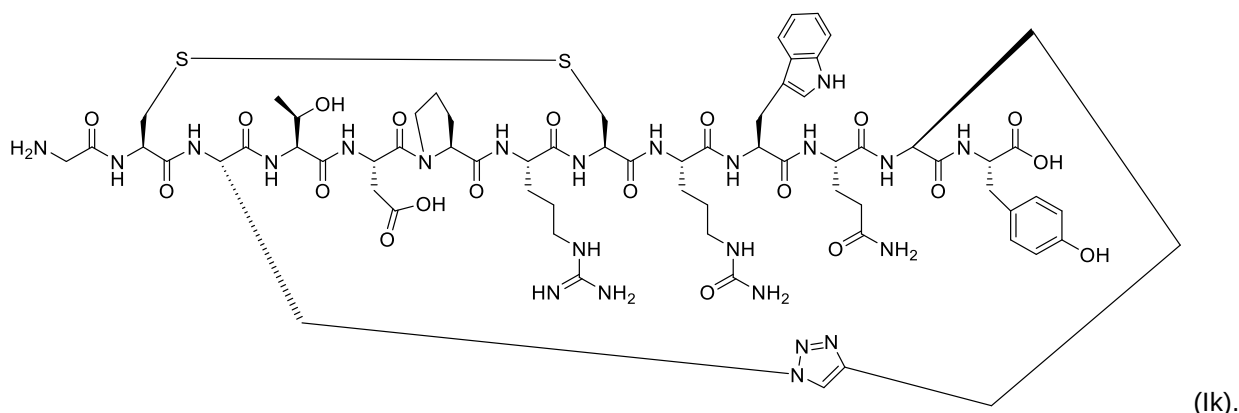
25

30

35

El análogo de péptido de conotoxina **lj** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **la** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zj** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 540.5 [M + 3H] / 3⁺, 810.1 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1617.66); HPLC método A; tiempo de retención: 12.04 min; pureza del 97.6 %.

Ejemplo 1.12 **Análogo de péptido de conotoxina Ik** (L-tirosina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-(2S)-2-aminopentanoil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-1, 4-diilo)) (SEQ ID NO: 42):

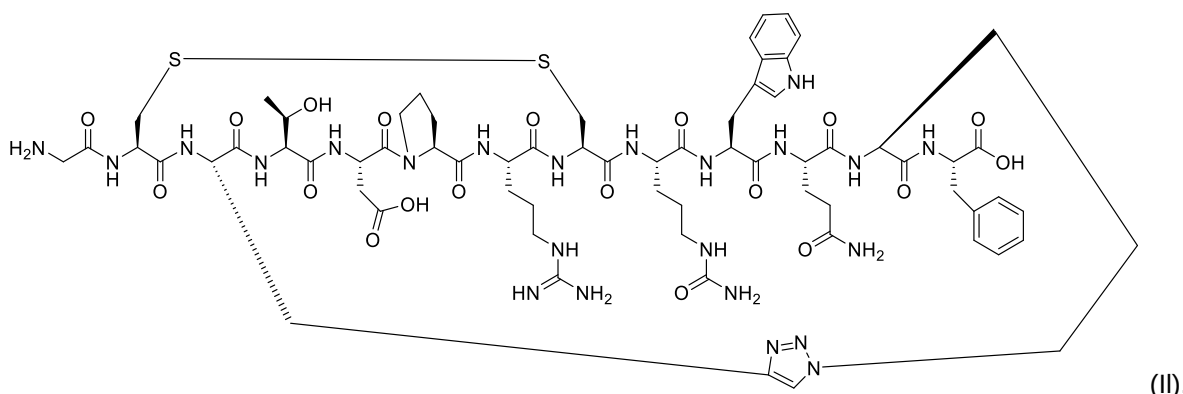


Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yk** (**H-Gly-Cys-3-azidoAla-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-bishomoPra-Tyr-OH**) (SEQ ID NO: 43): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yk** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de FMOC-3-azido-Ala-OH en lugar de FMOC-Pra-OH (el residuo en la posición 3) y FMOC-bis-homopropargil glicina en lugar de FMOC-5-azido-NVa-OH (el residuo en la posición 12) en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zk** (**H-Gly-Cys-3-azidoAla-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-bishomoPra-Tyr-OH, (Cys2 $\rightarrow$ Cys8) puente de disulfuro**) (SEQ ID NO: 44): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zk** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yk** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **Ik** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zk** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 540.6 [M + 3H] / 3⁺, 810.0 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1617.66); HPLC método A; tiempo de retención: 12.24 min; pureza del 97.6 %.

Ejemplo 1.13 **Análogo de péptido de conotoxina II** (L-fenilalanina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 45):



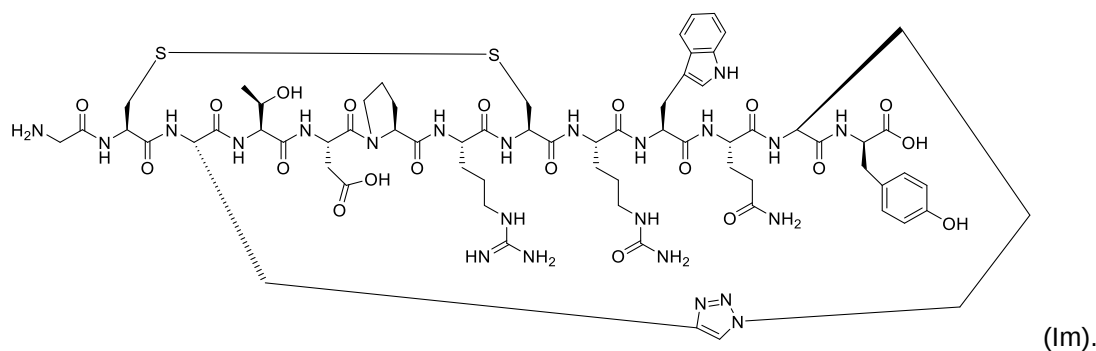
FMOC-Phe(OtBu)-OH (**5**) cargado con resina de 2-clorotritilo: El FMOC-Phe(OtBu)-OH cargado con resina de 2-clorotritilo se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para la resina de 2-clorotritilo **1** a través del uso de FMOC-Phe(OtBu)-OH en lugar de FMOC-Tyr(OtBu)-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **YI** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNva-Phe-OH**) (ID SEQ NO: 46): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **YI** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de FMOC-Phe(OtBu)-OH cargado con resina de 2-clorotritilo cargado con FMOC-Phe(OtBu)-OH (**5**) en lugar de la resina de 2-clorotritilo cargada con FMOC-Tyr(OtBu) (**1**) como el inicio del término C en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **ZI** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNva-Phe-OH, (Cys2 → Cys8) puente de disulfuro**) (SEQ ID NO: 47): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **ZI** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **YI** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **II** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **ZI** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z : 535.2 $[M + 3H]^+ / 3^+$, 802.2 $[M + 2H]^+ / 2^+$ (MW calculado: 1601.66); HPLC método A; tiempo de retención: 13.47 min; pureza del 95.6 %.

Ejemplo 1.14 Análogo de péptido de conotoxina Im (D-tirosina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-cíclico (2 → 8)-disulfuro-cíclico **3³**, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 48):



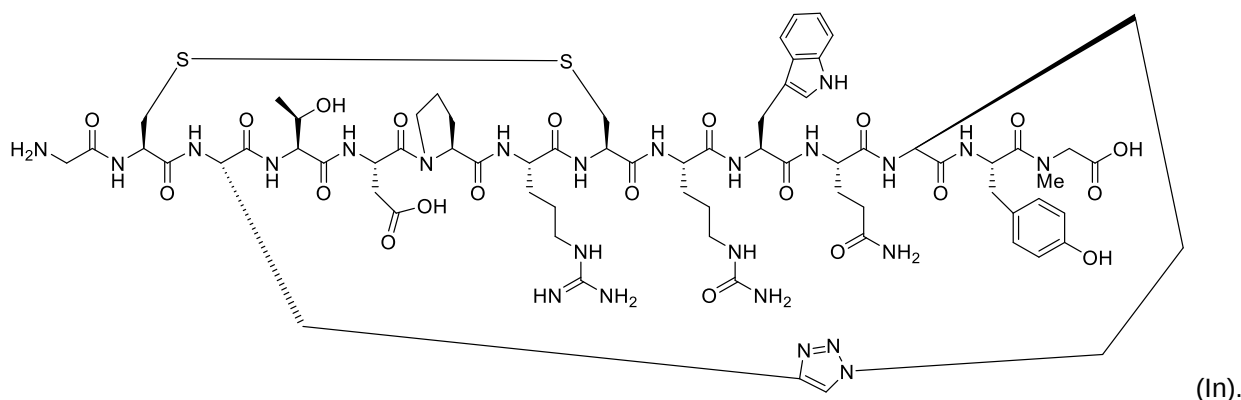
FMOC-D-Tyr(OtBu)-OH cargado con resina de 2-clorotritilo (**6**): El FMOC-D-Tyr(OtBu)-OH cargado con resina de 2-clorotritilo se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para la resina de 2-clorotritilo **1** a través del uso de FMOC-D-Tyr(OtBu)-OH en lugar de FMOC-Tyr(OtBu)-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ym** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-D-Tyr-OH**) (ID SEQ NO: 49): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ym** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con FMOC-D-Tyr(OtBu)-OH (**6**) en lugar de la resina de 2-clorotritilo cargada con FMOC-Tyr(OtBu) (**1**) como el inicio del término C en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zm** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-D-Tyr-OH, (Cys2 → Cys8) puente de disulfuro**) (SEQ ID NO: 50): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zm** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ym** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **Im** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zm** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z : 540.6 $[M + 3H]^+ / 3^+$, 810.0 $[M + 2H]^+ / 2^+$ (MW calculado: 1617.66); HPLC método A; tiempo de retención: 12.07 min; pureza del 86.6 %.

Ejemplo 1.15 Análogo de péptido de conotoxina In (glicina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-L-tirosil-N-metil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 51):



FMOC-N-Me-Gly-OH cargado con resina de 2-clorotritilo (**7**): El FMOC-N-Me-Gly-OH cargado con resina de 2-clorotritilo se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para la resina de 2-clorotritilo **1** a través del uso de FMOC-N-Me-Gly-OH en lugar de FMOC-Tyr(OtBu)-OH.

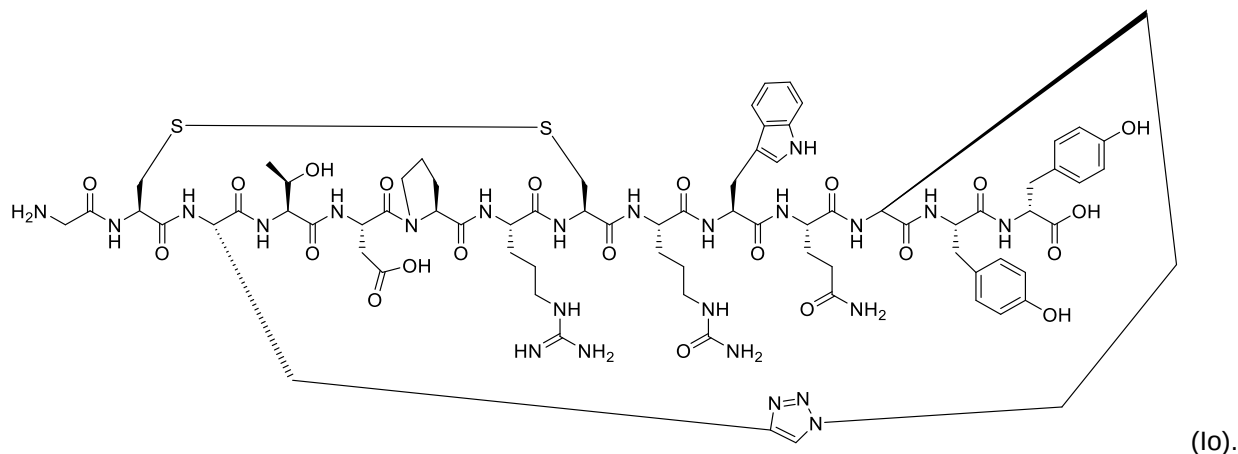
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yn** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-Tyr-N-Me-Gly-OH**) (SEQ ID NO: 52): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yn** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con FMOC-N-Me-Gly-OH (**7**) para añadir de forma

secuencial los aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en el siguiente orden con Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-5-azido-NVa-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Cit-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Pra-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, y Fmoc-Gly-OH.

5 Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zn** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-Tyr-N-Me-Gly-OH**, (**Cys2** → **Cys8**) **punto de disulfuro**) (SEQ ID NO: 53): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zn** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yn** en lugar del compuesto **3**.

10 El análogo de péptido de conotoxina **In** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **la** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zn** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 564.2 [M + 3H] / 3⁺, 846.0 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1688.69); HPLC método A; tiempo de retención: 11.63 min; pureza del 95.8%.

15 **Ejemplo 1.16 Análogo de péptido de conotoxina lo** (D-tirosina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L-α-aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-L-tirosil-cíclico (2 → 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 54):



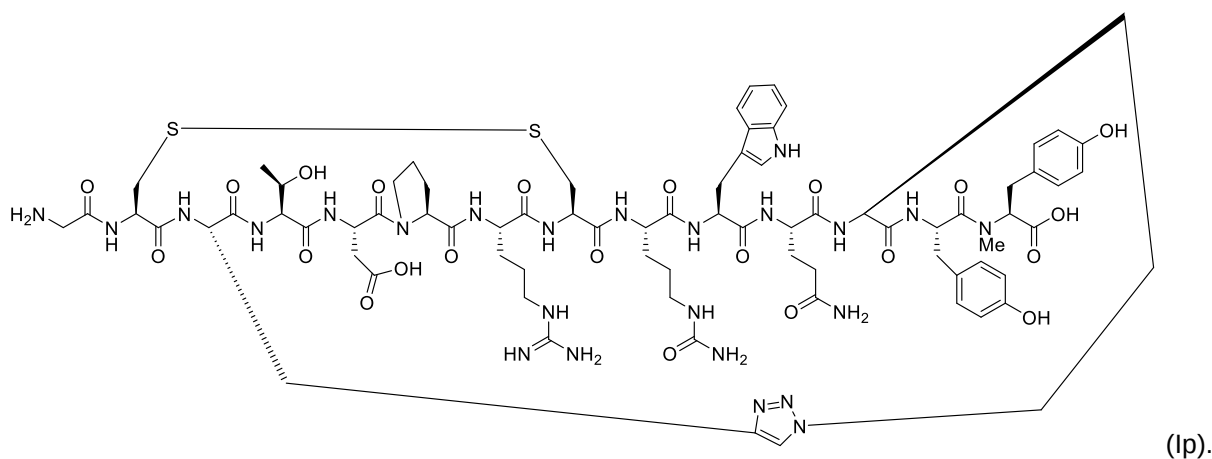
30 Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yo** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-Tyr-D-Tyr-OH**) (SEQ ID NO: 55): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yo** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con Fmoc-D-Tyr(OtBu)-OH para añadir de forma secuencial los aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en el siguiente orden con Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, Fmoc-5-azido-NVa-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Cit-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Pra-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, y Fmoc-Gly-OH.

35 Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zo** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-Tyr-D-Tyr-OH**, (**Cys2** → **Cys8**) **punto de disulfuro**) (SEQ ID NO: 56): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zo** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yo** en lugar del

compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **1o** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **1a** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zo** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 595.0 [M + 3H]⁺ / 3⁺, 891.7 [M + 2H]⁺ / 2⁺ (MW calculado: 1780.72); HPLC método A; tiempo de retención: 12.43 min; pureza del 97.4 %.

Ejemplo 1.17 Análogo de péptido de conotoxina 1p (L-tirosina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-L-tirosil-N-metil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 57):



FMOC-N-Me-Tyr-OH cargado con resina de 2-clorotritilo (**8**): El FMOC-N-Me-Tyr-OH cargado con resina de 2-clorotritilo se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para la resina de 2-clorotritilo **1** a través del uso de FMOC-N-Me-Tyr-OH en lugar de FMOC-Tyr(OtBu)-OH.

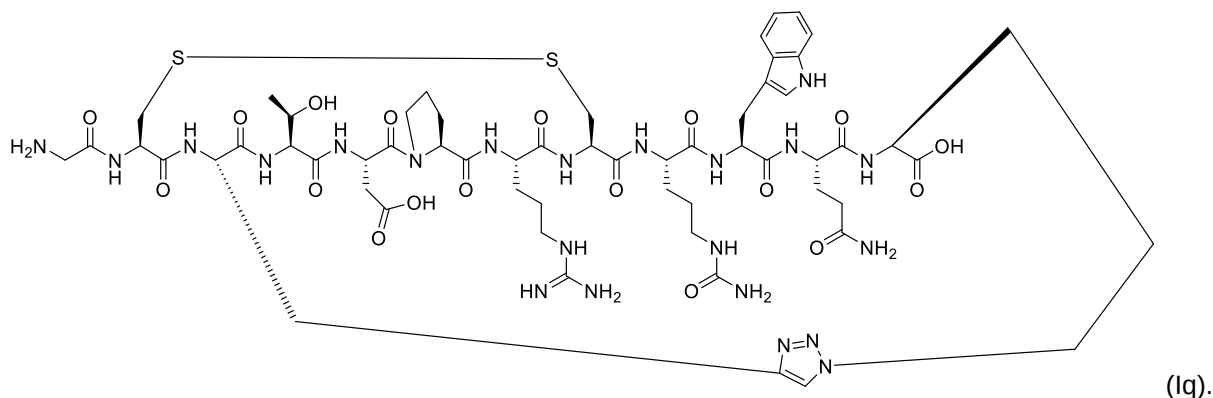
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yp** (SEQ ID NO: 58): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yp** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con FMOC-N-Me-Tyr-OH (**8**) para añadir de forma secuencial los aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en el siguiente orden con FMOC-Tyr(OtBu)-OH, FMOC-5-azido-NVa-OH, FMOC-Gln(Trt)-OH, FMOC-Trp(Boc)-OH, FMOC-Cit-OH, FMOC-Cys(Trt)-OH, FMOC-Arg(Pbf)-OH, FMOC-Pro-OH, FMOC-Asp(OtBu)-OH, FMOC-Thr(tBu)-OH, FMOC-Pra-OH, FMOC-Cys(Trt)-OH, y FMOC-Gly-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zp** (H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-Tyr-N-Me-Tyr-OH, (Cys2 $\rightarrow$ Cys8) puente de disulfuro) (SEQ ID NO: 59): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zp** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yp** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **1p** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **1a** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zp** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 599.7 [M + 3H]⁺ / 3⁺, 898.7 [M + 2H]⁺ / 2⁺ (MW calculado: 1794.74); HPLC método A; tiempo de retención: 12.56 min; pureza

del 95.5 %.

Ejemplo 1.18 **Análogo de péptido de conotoxina Iq** (L-norvalina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 60):



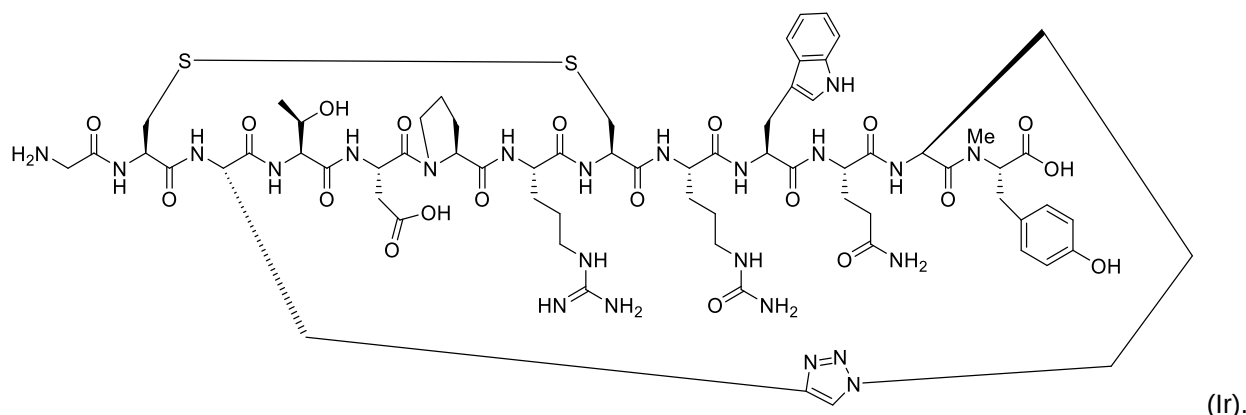
FMOC-5-azido-NVa-OH cargado con resina de 2-clorotritilo (**9**): El FMOC-5-azido-NVa-OH cargado con resina de 2-clorotritilo se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para la resina de 2-clorotritilo **1** a través del uso de FMOC-5-azido-NVa-OH en lugar de FMOC-Tyr(OtBu)-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yq** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-OH**) (ID SEQ NO: 61): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yq** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con FMOC-5-azido-NVa-OH (**9**) para añadir de forma secuencial los aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en el siguiente orden con FMOC-Gln(Trt)-OH, FMOC-Trp(Boc)-OH, FMOC-Cit-OH, FMOC-Cys(Trt)-OH, FMOC-Arg(Pbf)-OH, FMOC-Pro-OH, FMOC-Asp(OtBu)-OH, FMOC-Thr(tBu)-OH, FMOC-Pra-OH, FMOC-Cys(Trt)-OH, y FMOC-Gly-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zq** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-OH, (Cys2 $\rightarrow$ Cys8) puente de disulfuro**) (SEQ ID NO: 62): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zq** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yq** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **Iq** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zq** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI-TOF) m/z: 1455.5 (M + 1H) /⁺ (MW calculado: 1454.59); HPLC método A; tiempo de retención: 11.4 min; pureza del 95.0 %.

Ejemplo 1.19 **Análogo de péptido de conotoxina Ir** (L-tirosina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-N-metil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 63):

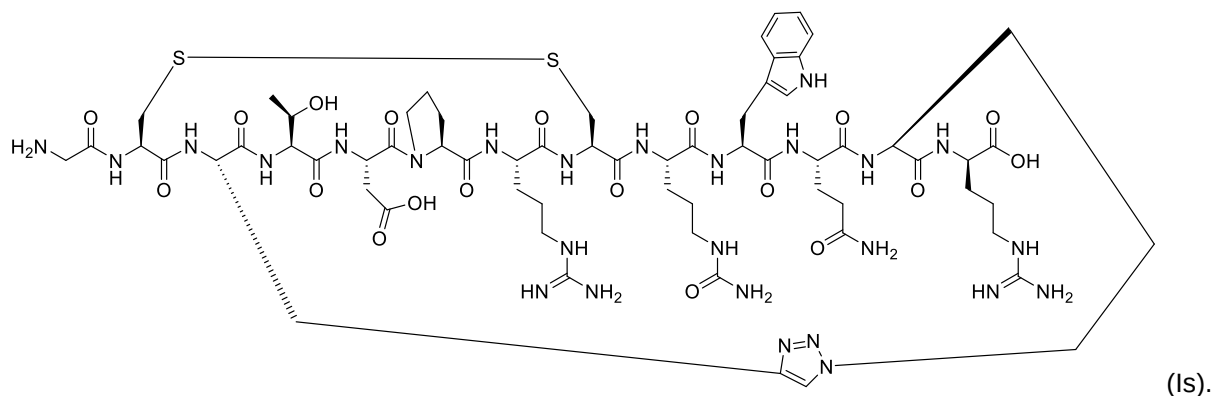


Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yr** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNva-N-Me-Tyr-OH**) (ID SEQ NO: 64): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yr** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con Fmoc-N-Me-Tyr-OH para añadir de forma secuencial los aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en el siguiente orden con Fmoc-5-azido-Nva-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Cit-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Pra-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, y Fmoc-Gly-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zr** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNva-N-Me-Tyr-OH, (Cys2 → Cys8) puente de disulfuro**) (SEQ ID NO: 65): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zr** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yr** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **Ir** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zr** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z : 545.3 $[M + 3H] / 3^+$, 817.0 $[M + 2H] / 2^+$ (MW calculado: 1631.67); HPLC método A; tiempo de retención: 12.01 min; pureza del 96.4 %.

Ejemplo 1.20 Análogo de péptido de conotoxina Is (D-arginina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-cíclico (2 → 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 66):



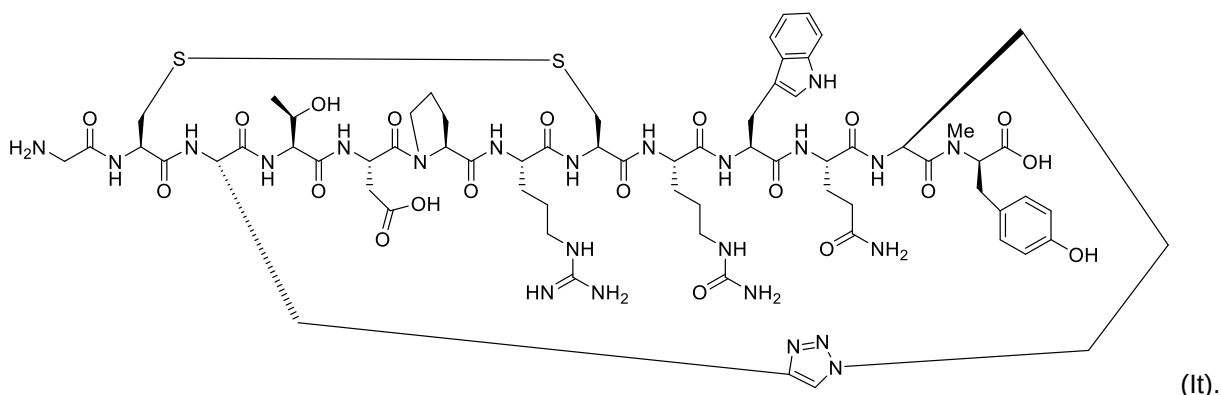
FMOC-D-Arg-OH cargado con resina de 2-clorotritilo (**10**): El FMOC-D-Arg-OH cargado con resina de 2-clorotritilo se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para la resina de 2-clorotritilo 1 a través del uso de FMOC-D-Arg-OH en lugar de FMOC-Tyr(OtBu)-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ys** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNva-D-Arg-OH**) (ID SEQ NO: 67): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ys** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con FMOC-D-Arg-OH (**10**) para añadir de forma secuencial los aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en el siguiente orden con FMOC-5-azido-Nva-OH, FMOC-Gln(Trt)-OH, FMOC-Trp(Boc)-OH, FMOC-Cit-OH, FMOC-Cys(Trt)-OH, FMOC-Arg(Pbf)-OH, FMOC-Pro-OH, FMOC-Asp(OtBu)-OH, FMOC-Thr(tBu)-OH, FMOC-Pra-OH, FMOC-Cys(Trt)-OH, y FMOC-Gly-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zs** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNva-D-Arg-OH, (Cys2 → Cys8) puente de disulfuro**) (SEQ ID NO: 68): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zs** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Ys** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **Is** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zs** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 539.2 [M + 3H] / 3⁺, 807.0 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1610.69); HPLC método A; tiempo de retención: 10.52 min; pureza del 97.1 %.

Ejemplo 1.21 Análogo de péptido de conotoxina It (D-tirosina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-N-metil-cíclico (2 → 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 69):



FMOC-N-Me-D-Tyr-OH cargado con resina de 2-clorotritilo (**11**): El FMOC-N-Me-Tyr-OH cargado con resina de 2-clorotritilo se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para la resina de 2-clorotritilo 1 a través del uso de FMOC-N-Me-D-Tyr-OH en lugar de FMOC-Tyr(OtBu)-OH.

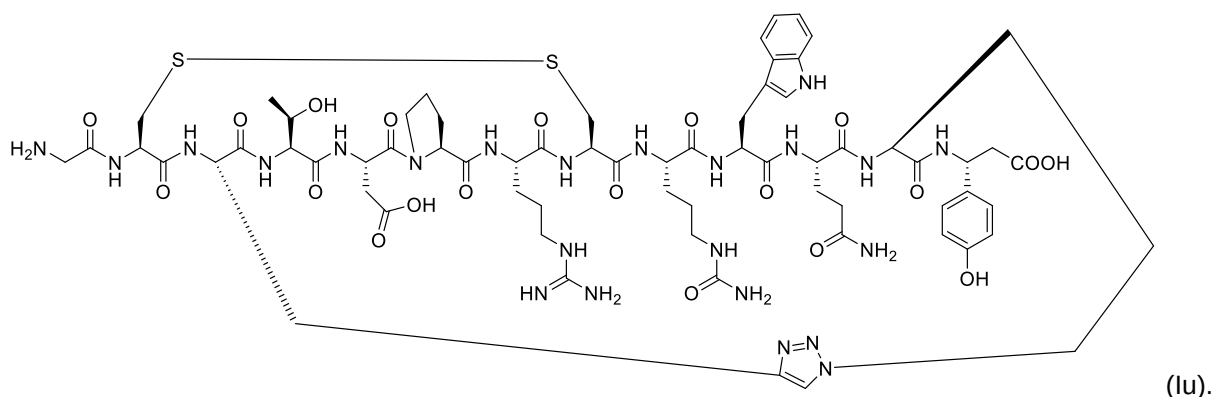
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yt** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNva-N-Me-D-Tyr-OH**) (ID SEQ NO: 70): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yt** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con FMOC-N-Me-D-Tyr-OH para añadir de forma secuencial los

aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en el siguiente orden con Fmoc-5-azido-NVa-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Cit-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Pra-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, y Fmoc-Gly-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zt** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-N-Me-D-Tyr-OH**, (**Cys2** → **Cys8**) **punto de disulfuro**) (SEQ ID NO: 71): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zt** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yt** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **It** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **la** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zt** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 545.3 [M + 3H] / 3⁺, 817.0 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1631.67); HPLC método A; tiempo de retención: 10.72 min; pureza del 96.6 %.

Ejemplo 1.22 Análogo de péptido de conotoxina lu (ácido (R)-3-(amino)-3-(4-hidroxifenil)propiónico, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-cíclico (2 → 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 72):



Fmoc-beta-Tyr-OH cargado con resina de 2-clorotritilo (**12**): El Fmoc-beta-Tyr-OH cargado con resina de 2-clorotritilo se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para la resina de 2-clorotritilo 1 a través del uso de Fmoc-beta-Tyr-OH en lugar de Fmoc-Tyr(OtBu)-OH.

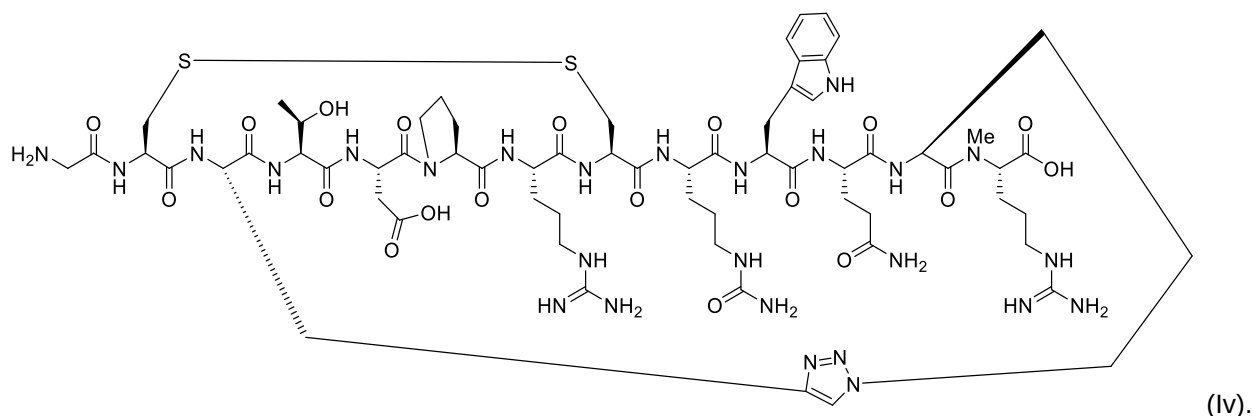
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yu** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-beta-Tyr-OH**) (ID SEQ NO: 73): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yu** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con Fmoc-beta-Tyr-OH (**12**) para añadir de forma secuencial los aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en el siguiente orden con Fmoc-5-azido-NVa-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Cit-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Pra-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, y Fmoc-Gly-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zu** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-beta-Tyr-OH**, (**Cys2** → **Cys8**) **punto de disulfuro**) (SEQ ID NO: 74): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zu** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe

para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yu** en lugar del compuesto **3**.

El análogo de péptido de conotoxina **Iu** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zu** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 544.5 [M + 3H]⁺, 816.3 [M + 2H]⁺ / 2⁺ (MW calculado: 1631.67); HPLC método A; tiempo de retención: 10.28 min; pureza del 98.8 %.

Ejemplo 1.23 Análogo de péptido de conotoxina Iv (L-arginina, glicil-L-cisteinil-L-alanil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-triptofil-L-glutaminil-L-norvalil-N-metil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico 3³, 12⁵-(1H-1, 2, 3-triazol-4, 1-diilo)) (SEQ ID NO: 75):



FMOC-N-Me-Arg-OH cargado con resina de 2-clorotritilo (**13**): El FMOC-N-Me-Arg-OH cargado con resina de 2-clorotritilo se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para la resina de 2-clorotritilo **1** a través del uso de FMOC-N-Me-Arg-OH en lugar de FMOC-Tyr(OtBu)-OH.

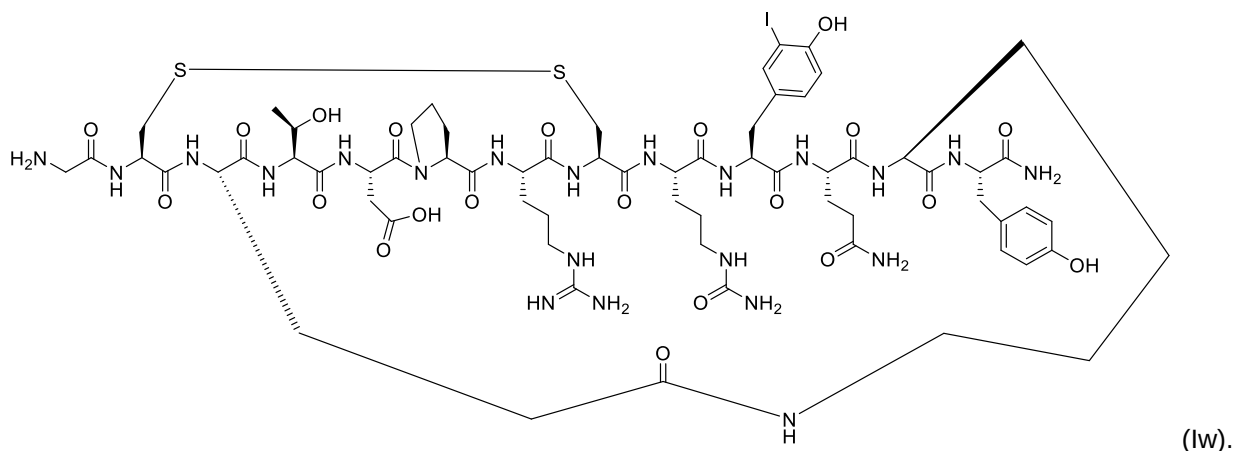
Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yv** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-N-Me-Arg-OH**) (ID SEQ NO: 76): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yv** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **3** a través del uso de resina de 2-clorotritilo cargada con FMOC-N-Me-Arg-OH (**13**) para añadir de forma secuencial los aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en el siguiente orden con FMOC-5-azido-NVa-OH, FMOC-Gln(Trt)-OH, FMOC-Trp(Boc)-OH, FMOC-Cit-OH, FMOC-Cys(Trt)-OH, FMOC-Arg(Pbf)-OH, FMOC-Pro-OH, FMOC-Asp(OtBu)-OH, FMOC-Thr(tBu)-OH, FMOC-Pra-OH, FMOC-Cys(Trt)-OH, y FMOC-Gly-OH.

Análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zv** (**H-Gly-Cys-Pra-Thr-Asp-Pro-Arg-Cys-Cit-Trp-Gln-5-azidoNVa-N-Me-Arg-OH, (Cys2 $\rightarrow$ Cys8) puente de disulfuro**) (SEQ ID NO: 77): El análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zv** se sintetizó por medio del mismo procedimiento que se describe para el compuesto **4** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Yv** en lugar del compuesto **3**.

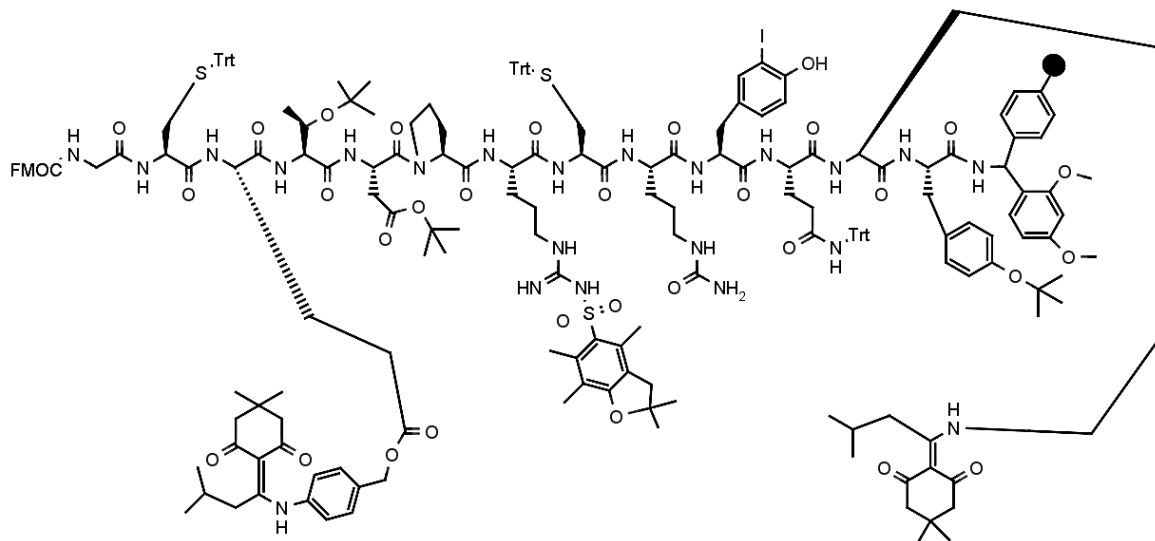
El análogo de péptido de conotoxina **Iv** se sintetizó por medio del empleo del mismo procedimiento que se describe para el análogo de péptido de conotoxina **Ia** a través del uso del análogo de péptido de conotoxina intermediario **Zv** en lugar del compuesto **4**. LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 542.9 [M + 3H]⁺, 813.5 [M + 2H]⁺ / 2⁺ (MW calculado: 1624.71); HPLC método A; tiempo de retención: 9.29 min; pureza

del 95.9 %.

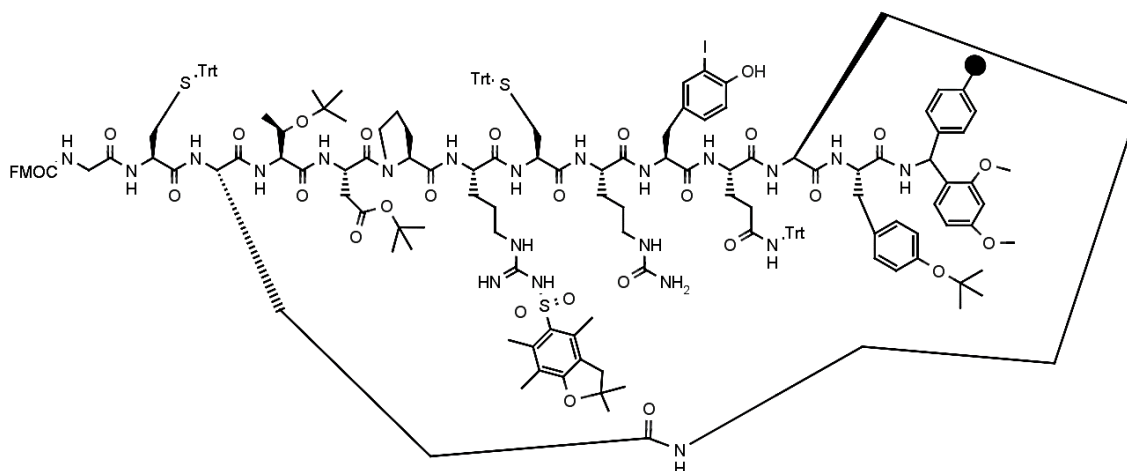
Ejemplo 1.24 Análogo de péptido de conotoxina lw (L-tirosinamida, glicil-L-cisteinil-L-glutamil-L-treonil-L- α -aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-3-yodotirosil-L-glutaminil-L-lisil-cíclico (2 $\rightarrow$ 8)-disulfuro-cíclico-(3 $\rightarrow$ 12)-lactama) (SEQ ID NO: 78):



Síntesis de péptido lineal intermediario (X1) (SEQ ID NO: 79): SE lavó con DMF (10 mL) la resina de MBHA de Rink amida cargada con Fmoc-Tyr(OtBu) (1.7 g, 0.5 mmol) se lavó con DMF (10 mL) y luego se drenó por completo. El grupo Fmoc se retiró a partir del grupo Tyr atado por medio de su tratamiento con 1: 4 de piperidina/ DMF (2 x 10 mL, 15 min cada una), y después la resina se lavó con DMF (6 x 10 mL). A continuación se añadieron HATU (CAS # 148893-10-1, 0.38 g, 1 mmol), HOAt (CAS # 39968-33-7, 0.14 g, 1 mmol) y DIPEA (0.25 mL, 1.5 mmol) con Fmoc-Lys(ivDde)-OH (CAS # 204777-78-6, 0.57 g, 1 mmol) en DMF (10 mL). El recipiente de reacción se agitó durante un mínimo de 2.5 h, seguido de un lavado con DMF (6 x 10 mL). La integridad de la reacción se determinó por medio del ensayo de la ninhidrina. Si fue negativo (incolore), el acoplamiento se consideró completo y se continuó la síntesis. Si fue positivo (azul), se acopló un segundo equivalente de la misma Fmoc-aminoácido (1 mmol) en DMF (10 mL) a través del uso de la resina y HATU/HOAt (1 mmol/1 mmol) tal y como se describe anteriormente. Una vez que la prueba de la ninhidrina indicó que la reacción estaba completa, se eliminó el Fmoc de cada uno de los aminoácidos que se añadieron en secuencia, seguido del acoplamiento del siguiente Fmoc-aminoácido-OH en la secuencia peptídica tal y como se describe anteriormente. Esto se llevó a cabo sucesivamente en el siguiente orden con Fmoc-Gln(Trt)-OH (CAS # 132327-80-1, 0.61 g, 1 mmol), Fmoc-(3-I-Tyr)-OH (CAS # 134486-00-3, 0.53 g, 1 mmol), Fmoc-Cit-OH (CAS # 133174-15-9, 0.39 g, 1 mmol), Fmoc-Cys(Trt)-OH (CAS # 103213-32-7, 0.58 g, 1 mmol), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (CAS # 154445-77-9, 0.64 g, 1 mmol), Fmoc-Pro-OH (CAS # 71989-31-6, 0.33 g, 1 mmol), Fmoc-Asp(OtBu)-OH (CAS # 71989-14-5, 0.41 g, 1 mmol), Fmoc-Thr(tBu)-OH (CAS # 71989-35-0, 0.39 g, 1 mmol), Fmoc-Glu(ODmab) (CAS # 268730-86-5, 0.68 g, 1 mmol), Fmoc-Cys(Trt)-OH (0.58 g, 1 mmol), y Fmoc-Gly-OH (CAS # 29022-11-5, 0.29 g, 1 mmol). Después de que se completaron los acoplamientos de los péptidos lineales, la resina se lavó con DMF (10 mL x 6), seguida de MeOH (10 mL x 2) y por último Et₂O (10 mL x 2) y, a continuación, se secó al vacío durante 2 h.

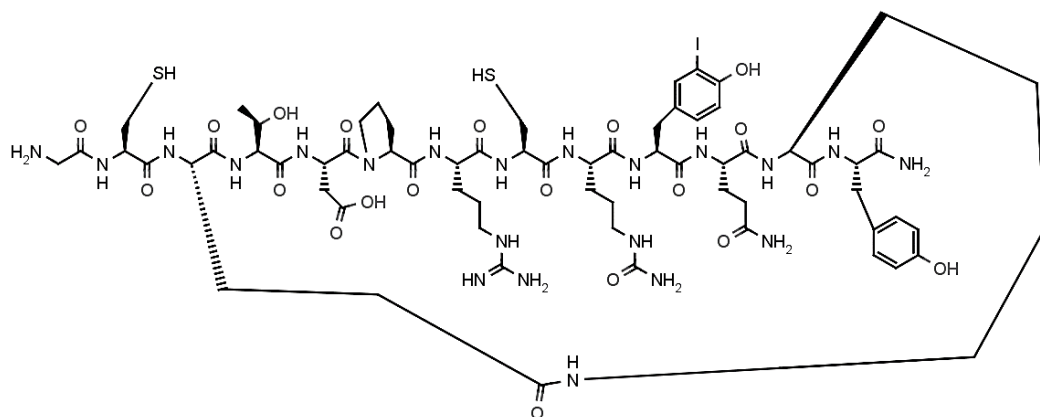
**X1**

Formación de lactama para producir el intermediario X2 sobre resina (SEQ ID NO: 80): Con el fin de retirar los grupos de protección de ivDde y ODma b a partir de los residuos de Lys12 y Glu3, respectivamente, la resina peptídica se lavó con DMF (10 mL) y luego se drenó por completo, después la resina se incubó con hidrato de hidrazina al 2 % en DMF (10 mL) durante 1 h a rt. Posteriormente, la resina se lavó con DMF (6 x 10 mL) y luego se volvió a suspender en DMF (10 mL), seguido del tratamiento con HATU (0.38 g, 1 mmol), HOAt (0.14 g, 1 mmol) y DIPEA (0.25 mL, 1.5 mmol). El recipiente de reacción se agitó durante un mínimo de 2.5 h, seguido de lavado con DMF (6 x 10 mL), luego MeOH (10 mL x 2) y por último Et₂O (10 mL x 2), y a continuación se secó al vacío durante 2 h.

**X2**

Disociación de la resina para proporcionar el intermediario X3 (SEQ ID NO: 81): La lactama se disoció de la resina por medio de la incubación del intermediario **X2** en 23 mL de la solución de disociación (TFA/ EDT/ tioanisol/ anisol: 30: 3: 5: 2) y la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la resina se filtró y se lavó con TFA (2 x 5 mL). Los filtrados se combinaron, y se añadió 10 veces el volumen de Et₂O frío (0 °C), lo que dio como resultado la precipitación del péptido. El péptido precipitado se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y se lavó con Et₂O frío (0 °C) (3 x 5 mL). El producto

crudo **X3** se secó al vacío durante 2 h para obtener el péptido lactámico 3 → 12 monocíclico crudo intermediario (**X3**, MW = 1727.7 g por mol, 0.4 g, 0.23 mmol, 46 %), el cual se utilizó sin purificación adicional.

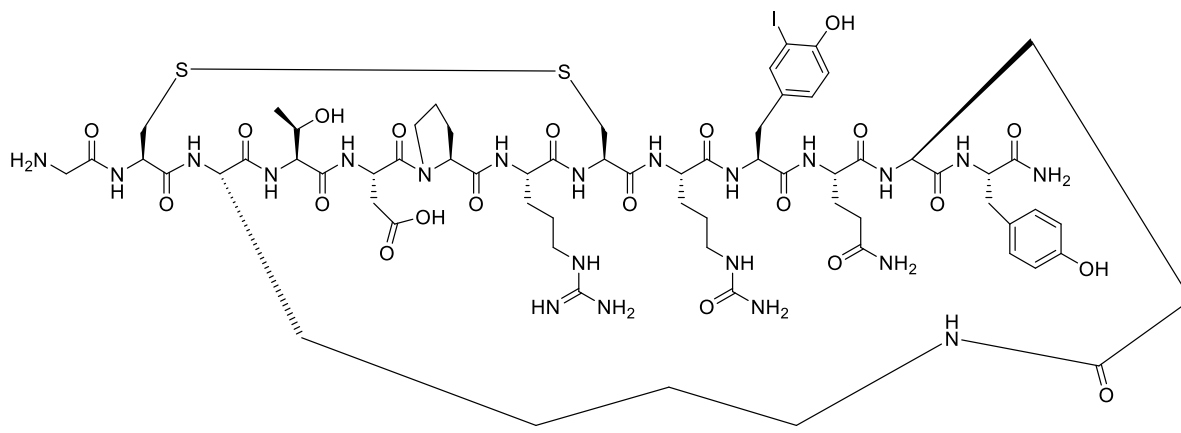
**X3**

Formación de puente de disulfuro para proporcionar el análogo de péptido de conotoxina **Iv**:

El intermediario **X3** (0.4 g, 0.23 mmol) se disolvió en CH₃CN (10 mL), DMSO (10 mL) y H₂O (180 mL). A continuación, se añadió por goteo H₂O₂ (al 30 % en H₂O, 25 µL), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. Después de este tiempo, la mezcla se filtró, y el filtrado se purificó por medio de una HPLC método J, para proporcionar 50 mg del análogo de péptido de conotoxina **Iv** como un sólido blanco (MW = 1725.6 g por mol, 29 µmol, rendimiento de este paso: 12.6 %, sal de TFA). Pureza del 82 % (230 nm).

El péptido se purificó aún más mientras que se intercambiaba el anión de TFA por acetato por medio de una HPLC de preparación de acuerdo con el método que se describe para los análogos de péptidos de conotoxina **Ia**. El rendimiento aislado del análogo de péptido de conotoxina **Iv** (sal de acetato) fue de 20 mg (12 µmol, rendimiento global del 2.4 %). LC-MS (ESI cuádruple simple) m/z: 576.1 [M + 3H] / 3⁺, 863.5 [M + 2H] / 2⁺ (MW calculado: 1723.56); HPLC método K; tiempo de retención: 7.0 min; pureza del 97 %.

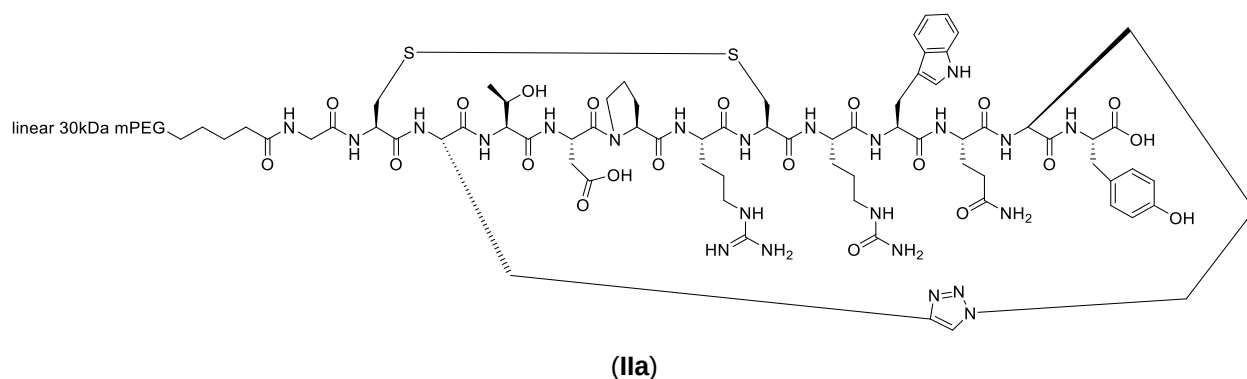
Ejemplo 1.25 Análogo de péptido de conotoxina **Ix** (L-tirosinamida, glicil-L-cisteinil-L-lysyl-L-treonil-L-α-aspartil-L-prolil-L-arginil-L-cisteinil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil-L-3-yodotirosil-L-glutaminil-L-glutamil-cíclico (2 → 8)-disulfuro-cíclico-(3 → 12)-lactama) (SEQ ID NO: 82):

**(Ix).**

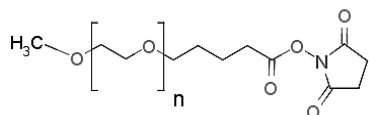
El análogo de péptido de conotoxina **Ix** se sintetizó por medio del empleo de los mismos procedimientos que se describen para el análogo de péptido de conotoxina **Iw** a través del uso de FMOC-Glu(ODmab) en lugar de FMOC-Lys(ivDde)-OH y FMOC-Lys(ivDde)-OH en lugar de FMOC-Glu(ODmab). LC-MS (ESI trampa de iones) m/z: 862.9 [M + 2H] / 2⁺, 1724.3 [M + H] / ⁺, (MW calculado: 1723.56); HPLC método K; tiempo de retención: 7.1 min; pureza del 95 %.

6.3. Ejemplo 2: Preparación de análogos de péptidos de conotoxina PEGilados

Ejemplo 2.1 Análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa (SEQ ID NO: 83) (30 kDa-mPEG-valerato (VA)-análogo de péptido de conotoxina Ia):



La sal de acetato del análogo de péptido de conotoxina **Ia** (25 mg, 0.015 mmol) se disolvió en el regulador de PBS (pH = 8.0, 12.5 mL) seguido de la adición de MPEG-30 kDa-VA-NHS éster (560 mg, 0.018 mmol; NOF América, SUNBRIGHT ME-300 HS; enlazador final = amida de ácido valérico ("VA");

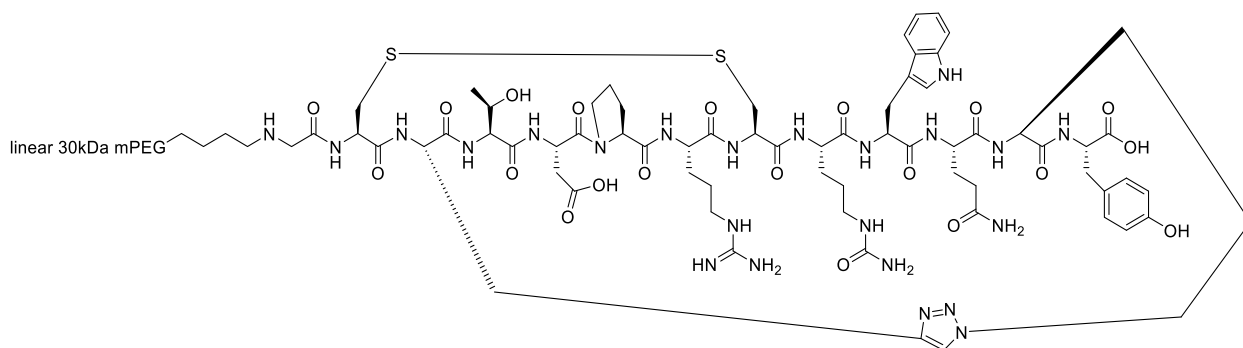


; promedio n = 675) en H₂O (20 mL). Después de agitar el recipiente de reacción durante 2 h a temperatura ambiente, el progreso de la reacción se monitoreó por medio de una HPLC analítica. Cuando se hubo consumido > 90 % del análogo de péptido de conotoxina **Ia**, de acuerdo con lo determinado por el análisis de HPLC, el péptido PEGilado resultante, es decir, análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IIa**, se purificó por medio de una HPLC método I para retirar el análogo de péptido de conotoxina **Ia** sin reaccionar (RT = 5.0 min). El pico de HPLC para el análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IIa** se fraccionó en tercios y cada fracción se analizó por medio de una HPLC método I con detección de ELSD (en línea, después del detector UV) para determinar la pureza del péptido (UV RT = 16.65 min, tiempo de retención de ELSD = 16.75 min) cantidad de PEG libre residual (ELSD RT = 17.00 min). Se combinaron y se liofilizaron las fracciones con > 95 % de pureza del péptido que contenían < 5 % de PEG libre, con base en la señal de ELSD (PEG libre en relación con la señal de ELSD del péptido). Rendimiento total aislado 0.21 g (44 %); HPLC método I: Pureza: 95 % (UV 214 nm), 97 % (ELSD). Los datos de caracterización del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IIa** se enlistan en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Datos de caracterización para el análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Ila**

Análisis	Resultado	Método
Masa determinada experimentalmente	32254.6	MALDI-TOF
Contenido de cobre	< 11 ppm	ICP-AES
Karl Fischer Contenido de agua	0.40 %	Análisis KF coulombimétrico
Contenido de nitrógeno	0.93 %	Análisis elemental
Contenido de péptidos	91.0 % (con base en el MW calculado: 31512)	Cálculo a través del uso del contenido de nitrógeno en el análisis elemental
Contenido de AcOH	0.549 %	Cromatografía de iones
Contenido de TFA	0.361 %	Cromatografía de iones

Ejemplo 2.2 Análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IVa** (SEQ ID NO: 84) (30 kDa-mPEG-bAmina-análogo de péptido de conotoxina **Ia**):

**(IVa)**

La sal de acetato del análogo de péptido de conotoxina **Ia** (25 mg, 0.013 mmol) se disolvió en MeOH (10 mL) seguido de la adición de una solución de mPEG-30 kDa-butiraldehído (CAS No. 9004-74-4, 414 mg, 0.013 mmol) en MeOH (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después de este tiempo, se añadió una solución de PPTS (3.3 mg, 0.013 mmol) en MeOH (0.1 mL), seguida de la adición de una solución de NaCNBH₃ (1.6 mg, 0.026 mmol) en MeOH (0.1 mL). La agitación se continuó

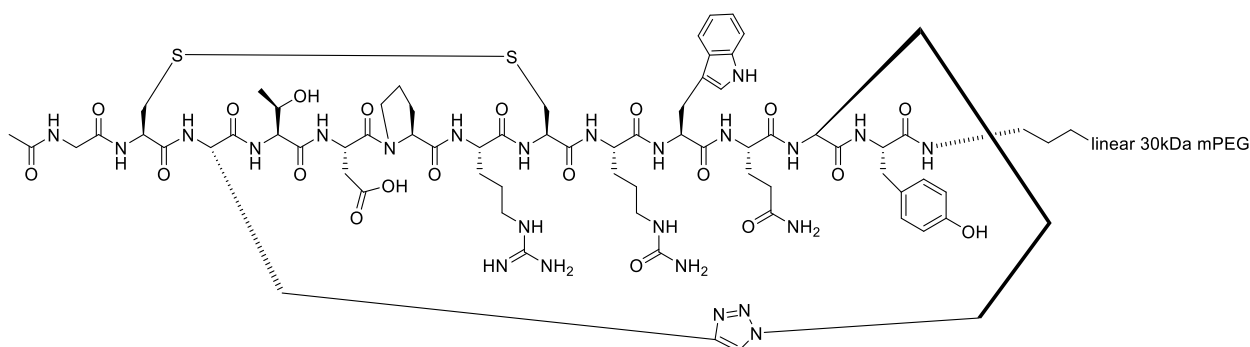
durante 12 h, y después de este tiempo la mezcla de reacción se purificó directamente por medio de una HPLC de preparación método G para proporcionar la sal de TFA del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IVa** (92 mg, rendimiento total: 21 %, sal de TFA). Pureza en HPLC: 95.7 % (UV 214 nm).

Se logró un intercambio de sal posterior por medio de la disolución de la sal de TFA del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IVa** (92 mg, 0.0027 mmol) de lo anterior, en 3 mL de agua. A esta solución se añadió por goteo el NH_4HCO_3 (ac.) para ajustar el pH de 7.0 a 8.0. A continuación, la mezcla se purificó directamente por medio de una RP-HPLC de preparación (fase móvil: A: AOH al 0.1 % en agua, B: AcOH al 0.1 % en ACN), y se liofilizó para proporcionar la sal de acetato del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IVa** como un sólido blanco (31 mg, rendimiento total: 7 %, sal de acetato). Pureza en LC/MS: 95.5 % (UV 214 nm), 98.7 % (ELSD). Los datos de caracterización del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IVa** se enlistan en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Datos de caracterización para el análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IVa**

Análisis	Resultado	Método
Masa determinada experimentalmente	33465.4	MALDI-TOF
Contenido de nitrógeno	1.00 %	Análisis de combustión C, H, N.
Contenido de péptidos	98.05 % (con base en el MW calculado: 31571.8)	Cálculo a través del uso del contenido de nitrógeno en el análisis elemental

Ejemplo 2.3 Análogo de péptido de conotoxina PEGilado Va en el término C (SEQ ID NO: 85) (análogo de péptido de conotoxina Ia-30 kDa-PEG)



(Va)

Análogo de péptido de conotoxina con N-acetilo en el término N **1a** intermediario (**14**): El análogo de péptido de conotoxina **1a** (75 mg, 46 μmol) se disolvió en DMF anhidra (35 mL) y luego se añadieron AC_2O (7.5 μL , 0.3 mmol) y piridina anhidra (32 μL , 0.4 mmol). La solución se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, el producto se purificó por medio de una HPLC de preparación método G (tabla 7). Después de la liofilización de las fracciones que contenían el producto, el compuesto **14** se obtuvo como un sólido blanquecino (44.5 mg, 27 μmol , 98 % de pureza, 59 % de rendimiento). LC-MS (ESI) m/z : 554.6 $[\text{M} + 3\text{H}]^+ / 3^+$, 831.0 $[\text{M} + 2\text{H}]^+ / 2^+$, Pureza del 98 % (UV 214 nm).

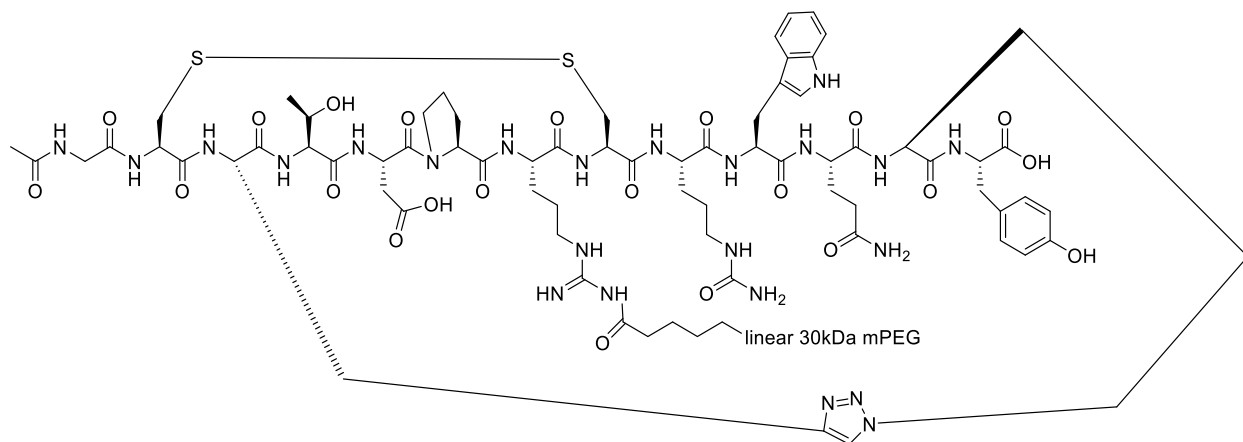
Análogo de péptido de conotoxina PEGilado en el término C Va: El compuesto **14** (15 mg, 9.0 μmol) se disolvió en DMF anhidra (2.5 mL) y se añadió una solución de 30 kDa-mPEG-propilamina (300 mg, 10 μmol , 1.1 equiv.) en DMF anhidra (2.5 mL). A continuación, se añadieron una solución de HBTU (3.7 mg, 9.7 μmol) en DMF (0.3 mL) y una solución de DIPEA (458 μL , 26 μmol) en DMF anhidra (45 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y luego se purificó por medio de una HPLC método G (tabla 7). La liofilización del producto purificado proporcionó la sal de TFA del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Va** en el término C (100 mg, 3.1 μmol , rendimiento del 35 %), como una sal de TFA (pureza del 91 % a 214 nm). A continuación, esta sal de TFA se disolvió en H_2O : CH_3CN (3 mL: 1 mL), luego se añadió por goteo una solución diluida de NH_4HCO_3 (ac.) para obtener un pH = 7.0 a 8.0. La mezcla entonces se purificó por medio de una HPLC método H (tabla 7) para proporcionar la sal de acetato del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Va** en el término C. Después de la liofilización, se obtuvo un sólido blanco (50 mg, rendimiento: 15.8 μmol , 17.5 %, sal de acetato). Pureza en LC: 90.4 % (UV 214 nm), 99.3 % (ELSD). Los datos de caracterización para el análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Va** se enlistan en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Datos de caracterización para el análogo de péptido de conotoxina PEGilado Va

Análisis	Resultado	Método
Masa determinada experimentalmente	31307.7	MALDI-TOF
Contenido de nitrógeno	0.71 %	Análisis de combustión C, H, N.
Contenido de péptidos	66.77 % (con base en el MW calculado: 31598.8)	Cálculo a través del uso del contenido de nitrógeno en el análisis elemental

Ejemplo 2.4 7-Arg-análogo de péptido de conotoxina PEGilado VIa (SEQ ID NO: 86) (Ac-análogo de péptido de conotoxina Ia (Arg7-VA-30 kDa-PEG))



(VIa)

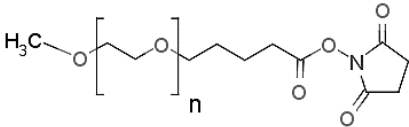
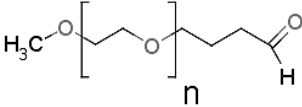
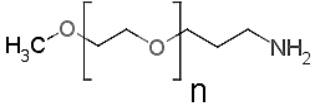
El análogo de péptido de conotoxina **Ia** con N-acetilo en el término N, intermediario **14** (15 mg, 9.0 μmol) se disolvió en DMF anhidra (2.5 mL) seguida de la adición de una solución del reactivo de mPEG-30 kDa-ácido valérico-NHS éster (0.54 g, 18 μmol) en DMF anhidra (2.5 mL). A continuación, se añadió una solución de DBU (4 μL , 27 μmol) en DMF (0.3 mL). La mezcla se calentó hasta 40 °C durante 4 h y, a continuación, el producto se purificó por medio de una HPLC método G (tabla 7). La liofilización posterior proporcionó 35 mg de la sal de acetato del 7-Arg-análogo de péptido de conotoxina PEGilado **VIa** (tabla 6; 35 mg, 1.1 μmol , 12.2 %, sal de TFA). Pureza del 80 % (UV 214 nm). El intercambio de sal se llevó a cabo tal como se describió para proporcionar la sal de acetato del 7-Arg-análogo de péptido de conotoxina PEGilado **VIa** como un sólido blanco (28 mg, 9.8 % de rendimiento total, sal de acetato). Pureza: 99.1 % (UV 214 nm), 81.4 % (ELSD). Los datos de caracterización del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **VIa** se enlistan en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Datos de caracterización para análogo de péptido de conotoxina PEGilado VIa

Análisis	Resultado	Método
Masa determinada experimentalmente	32102.8	MALDI-TOF
Contenido de nitrógeno	0.55 %	Análisis de combustión C, H, N.
Contenido de péptidos	54.0 % (con base en el MW calculado: 31641.9)	Cálculo a través del uso del contenido de nitrógeno en el análisis elemental

Tabla 6. Reactivos de PEGilación

	Reactivo de PEGilación	Estructura
5	mPEG-30 kDa-ácido valérico-NHS éster promedio n = 675. Enlazador final = amida de ácido valérico ("VA")	
10	mPEG-30 kDa-butiraldehído Enlazador final = enlazador de butilamina ("bAmina") promedio n = 678	
15	mPEG-30 kDa-propilamina Enlazador final = propilamida ("pAmida") promedio n = 678	

Los métodos de HPLC que se describen en este documento se resumen en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Compendio de los métodos de HPLC

	Método de HPLC	Descripción
25	A	UV 214 nm; Columna: XBridge Péptido BEH C18, 4.6 x 150 mm, 3.5 μ m; Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.05 % en CH ₃ CN; Tiempo (% B): 0 min (5), 20 min (65); Velocidad de flujo: 1.0 mL por min; temperatura de la columna de 40 °C.
30	B	UV 220 nm; Columna: Phenomenex Jupiter, 4.6 x 250 mm, 5 μ m, C18, 300 Å; Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.05 % en CH ₃ CN; Tiempo (% B): 0 min (10), 30 min (70); Velocidad de flujo 1.0 mL por min; temperatura ambiente.
35	C	UV 220 nm; Columna: YMC-Pack-ODS-A, 4.6 x 250 mm, 5 μ m, C18, 200 Å; Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.05 % en CH ₃ CN; Tiempo (% B): 0 min (5), 30 min (65); 1.0 mL por min; temperatura ambiente.
	D	UV 220 nm; Columna: Phenomenex Jupiter, 4.6 x 250 mm, 5 μ m, C18, 300 Å; Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.05 % en CH ₃ CN; Tiempo (% B): 0 min (10), 30 min (70); Velocidad de flujo 1.0 mL por min; temperatura ambiente.

E	UV 220 nm; Columna: YMC-Pack-ODS-A, 4.6 x 250 mm, 5 µm, C18, 200 Å; Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.05 % en CH ₃ CN; Tiempo (% B): 0 min (5), 30 min (65); 1.0 mL por min; temperatura ambiente.
F	UV 215 nm; Columna: YMC-Pack-ODS-A, 4.6 x 250 mm, 5 µm, C18, 200 Å; Eluyente A: TFA al 0.1 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.1 % en CH ₃ CN; Tiempo (% B): 0 min (10), 30 min (40); 1.0 mL por min; temperatura ambiente.
G	UV 215 nm; Columna: XBridge Péptido BEH C18, 19 x 250 mm, 10 µm, 300 Å; Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.05 % en CH ₃ CN; Tiempo (% B): 0 min (17), 3 min (32), 23 min (42), 28 (95); Velocidad de flujo: 25 mL por min; temperatura ambiente.
H	UV 215 nm; Columna: XBridge Péptido BEH C18, 19 x 250 mm, 10 µm, 300 Å; Eluyente A: AOH al 0.1 % en agua; Eluyente B: AOH al 0.1 % en CH ₃ CN; tiempo (% B): 0 min (5), 5 min (25), 15 min (80), 20 (95); Velocidad de flujo: 20 mL por min; temperatura ambiente.
I	Detección de UV 214 nm y ELSD; Columna: XBridge Péptido BEH C18, 4.6 x 150 mm, 3.5 µm, 300 Å; Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.05 % en CH ₃ CN; Tiempo (% B): 0 min (15), 3 min (15), 20 min (75); Velocidad de flujo: 1.0 mL por min; temperatura de la columna de 40 °C.
J	UV 215 nm; Columna: XBridge Péptido BEH C18, 19 x 250 mm, 10 µm, 130 Å; Eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.05 % en CH ₃ CN; Velocidad de flujo: 20.0 mL por min; elución en gradiente del 5 % al 100 % de B; temperatura ambiente.
K	UV 230 nm; Columna: XBridge Péptido BEH C18, 2.1 x 150 mm, 3.5 µm; eluyente A: TFA al 0.05 % en agua; Eluyente B: TFA al 0.05 % en CH ₃ CN; Tiempo (% B): 0 min (5), 8 min (100); Velocidad de flujo: 0.3 mL por min; temperatura de la columna de 25 °C.

6.4. Análisis de estabilidad

Con el fin de abordar la inestabilidad del disulfuro en los derivados de RglA, se sintetizaron los análogos de péptidos de conotoxina con un puente de disulfuro sustituido por un puente de triazol, y se evaluaron en plasma y suero humanos y de rata Sprague Dawley.

El análisis de HPLC en fase inversa de las muestras de cada uno de los análogos de péptidos de conotoxina estabilizados con triazol reveló un único pico aislado consistente con la conformación nativa del

péptido. Por ejemplo, la figura 2A muestra que el análogo de péptido de conotoxina la muestra un único pico aislado en la HPLC en fase inversa en el plasma de la rata a las 0 h, 8 h y 24 h. No hubo ninguna evidencia de un reordenamiento de disulfuro, lo que sugiere que la sustitución de un enlace de disulfuro nativo por un mimético de triazol es adecuado para prevenir la mezcla en disulfuro de los derivados de RglA en el plasma.

Por el contrario, como se muestra en las trazas de la HPLC en fase inversa del análogo de péptido de conotoxina, el **CSP-4-NH₂** de la figura 2B, una porción significativa del análogo de péptido de conotoxina **CSP-4-NH₂** (la forma “nativa”, la cual consiste en dos enlaces de disulfuro, uno entre Cys2 y Cys8, y un segundo enlace entre Cys3 y Cys12) experimentó una isomerización en una forma de “cinta” que contenía enlaces de disulfuro alternativos de Cys2-Cys12 y Cys3-Cys8, y en una forma de “esfera” que contenía enlaces de disulfuro alternativos de Cys2-Cys3 y Cys8-Cys12. En las muestras de plasma y suero, el análogo del péptido de conotoxina **CSP-4-NH₂** se isomerizó principalmente entre las formas nativa y de cinta, con muy poca formación de esferas (figura 2B).

6.5. Ensayos biológicos

6.5.1. Método de sujeción de voltaje de dos electrodos para los NACHR de rata y humanos

Ejemplo 4.1

Ensayo:

Se utilizaron los ovocitos de *Xenopus laevis* (Xenopus 1, MI) para expresar heterológicamente los subtipos clonados de nAChR de rata o humano. Los registros se llevaron a cabo de 1 a 5 días después de la inyección. Brevemente, se colocó un ovocito en una cámara de 100 µL (4 mm de diámetro, 62 mm de profundidad) fabricada de Sylgard y perfundida por gravedad con ND96 (NaCl 96 mM, CaCl₂ 1.8 mM, KCl 2.0 mM, MgCl₂ 1.0 mM, HEPES 5 mM, pH de 7.1 a 7.5) a una velocidad de flujo constante (2 mL por min). El potencial de membrana del ovocito se mantuvo a -70 mV por medio de un amplificador de sujeción de voltaje de dos electrodos GeneClamp 500. Los nAChR se estimularon con pulsos de 1 segundo de acetilcolina (ACh) 100 µM una vez cada minuto y se adquirieron las corrientes activadas por ACh. Después de lograr una línea base constante de pulsos de ACh a través del uso de ND96, la solución se cambió al ND96 que contenía varias concentraciones del compuesto, y se observaron pulsos de ACh para una respuesta de bloqueo. Las respuestas a la ACh del nAChR después de la aplicación del péptido se calcularon como el “% de respuesta” del que se observó en la línea base. Las curvas de concentración-respuesta para la inhibición de las corrientes activadas por ACh se generaron por medio del ajuste de los datos de cada ovocito a la ecuación de Hill: % respuesta = $100 / \{1 + ([\text{toxina}] / \text{IC}_{50})^{nH}\}$ por medio del análisis de regresión no lineal y a través del uso de restricción en la parte inferior igual a 0 y en la parte superior igual a 100 (GraphPad Prism). Se ajustaron las curvas de respuesta a la concentración independientes por cada ovocito y se promediaron los valores de IC₅₀. Los valores promedio de IC₅₀ se notificaron como los promedios ± SEM. Se utilizó la prueba t no emparejada de dos colas para las diferencias de significación (GraphPad Prism).

Resultados:

6.5.1.1. La sustitución del puente de disulfuro por un puente de triazol mejora la estabilidad y mantiene una actividad adecuada los nAChR tanto de la rata como del humano

Tabla 8. Inhibición de los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) $\alpha 9\alpha 10$ de rata y humanos por medio del péptido de conotoxina RglA y sus análogos

Péptido de conotoxina / análogo	$\alpha 9\alpha 10$ nAChR IC ₅₀ (nM)	
	Rata	Humano
RglA	2.4 ± 0.7	> 10,000
CSP-4-OH	0.9 ± 0.6	1.5 ± 0.5
CSP-4-NH₂	0.4 ± 0.2	3.5 ± 1.5
CSP-4-desTyr	NT	42 ± 0.1
Ia	14.3 ± 1.8	0.7 ± 0.03
Ia'	12.61 ± 0.08	26 ± 4
Ib	7 ± 0.7	37 ± 1.3
Ib'	2.3 ± 0.5	48 ± 9
Ic	69 ± 8.5	152 ± 71
Id	≥ 1000	≥ 1000
Ie	6.6 ± 1.7	115 ± 56
If	12.5 ± 8.7	1521 ± 116
Ig	22 ± 1.1	19 ± 1.2
Ih	8.5 ± 1.1	8 ± 1.5
Ii	1.6 ± 0.6	3.4 ± 1.4
Ij	69 ± 8.5	152 ± 71

Péptido de conotoxina / análogo	$\alpha 9\alpha 10$ nAChR IC ₅₀ (nM)	
	Rata	Humano
Ik	9.5 ± 1.3	16.6 ± 1.1
Il	NT	11 ± 1.4
Im	NT	50 ± 1.2
In	≤ 10 nM	37 ± 15
Io	≤ 10 nM	59
Ip	≤ 10 nM	26 ± 1.4
Iq	69 ± 2	> 300 nM
Ir	31 ± 0.7	~ 100
Is	NT	59 ± 1.7
It	NT	~ 100 nM
Iu	< 30	~ 100 nM
Iv	< 30	~ 100 nM
Iw	36 ± 9	> 300
Ix	21 ± 1.4	123 ± 22

Nota: NT = No probado.

Se determinaron las actividades de los análogos de péptidos de conotoxina y de los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados preparados en las secciones 6.2 y 6.3 en los nAChR tanto de rata como humanos, y los resultados se compendian en las tablas 8 y 9, respectivamente.

Como se muestra en la tabla 8, el CSP-4-NH₂ mostró actividades nanomolares en los nAChR tanto de rata como humanos (IC₅₀: 0.4 ± 0.2 nM en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de rata y 3.5 ± 1.5 nM en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano). No obstante, debido a que el CSP-4-NH₂ tiene dos puentes de disulfuro (un puente de disulfuro entre los residuos de cisteína en las posiciones 2 y 8; y otro puente de disulfuro entre los residuos de cisteína en las posiciones 3 y 8), el CSP-4-NH₂ sufrió de un problema de mezcla en disulfuro y tuvo una

estabilidad deficiente (véanse la figura 1A a la figura 1D y la figura 2B).

Como se muestra en la tabla 8, los análogos de péptidos de conotoxina **Iw** y **Ix** con el puente de disulfuro en las posiciones 3 y 12 reemplazado por un puente de lactama, no mantuvieron actividades adecuadas en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. Los análogos de péptidos de conotoxina **Iw** y **Ix** mostraron las IC_{50} de > 300 nM y de 123 ± 22 nM, respectivamente. Ciertos análogos de péptidos de conotoxina que tenían un puente de triazol formado entre un Pra en la posición 3 y un AzidoNVa en la posición 12 mantuvieron actividades biológicas adecuadas en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano (por ejemplo, $IC_{50} < 100$ nM). Por ejemplo, se midieron las IC_{50} de los análogos de péptidos de conotoxina **Ia** y **Ia'** en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano y fueron de 0.7 ± 0.03 nM y de 26 ± 4 nM, respectivamente. Las IC_{50} de los análogos de péptidos de conotoxina **Ib** y **Ib'** en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano se midieron en 37 ± 1.3 nM y 48 ± 9 nM, respectivamente. Los análogos de péptidos de conotoxina **Ia** y **Ib**, con un ácido carboxílico en el término C, y los análogos de péptidos de conotoxina **Ia'** y **Ib'**, con un grupo amida en el término C, mantuvieron actividades adecuadas. Los análogos de péptidos de conotoxina **Ia** y **Ib**, ambos con un grupo amida en el término C, mostraron cada uno valores de IC_{50} más bajos que el análogo de péptido de conotoxina correspondiente con un ácido carboxílico en el término C (**Ia** vs **Ia'** y **Ib** vs **Ib'**).

Por el contrario, los análogos de péptidos de conotoxina **Ic** y **Id** que tenían un puente de triazol formado entre las posiciones 2 y 8, no mantuvieron una actividad adecuada en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. Se midieron las IC_{50} de los análogos de péptidos de conotoxina **Ic** y **Id** y fueron de 152 ± 71 nM y ≥ 1000 nM, respectivamente. También en contraste, los análogos de péptidos de conotoxina **If** y **Ij** que tenían un puente de triazol formado entre las posiciones 3 y 12, pero que tenían un puente de triazol formado a partir de un Pra o un AzidoAla, respectivamente, en la posición 12 no mantuvieron una actividad adecuada en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. Se midieron las IC_{50} de los análogos de péptidos de conotoxina **If** y **Ij** y fueron de 1521 ± 116 nM y de 152 ± 71 nM, respectivamente.

Anteriormente se ha demostrado que la supresión del aminoácido terminal de RgIA y la sustitución por una amida (Cys12-amida) no tienen un impacto sustancial sobre el enlace del péptido al nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de rata (Ellison et al, 2008, J. Mol. Biol. 377: 1216-1227; Armishaw, 2010, Toxins 2: 1471-1499; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. US 20120220539 A1). Además, otras alfa-conotoxinas, tales como Vc1.1 e Iml, no tienen un aminoácido en la posición 13 (véase la figura 4), lo que sugiere que este residuo no sería esencial para el enlace del canal.

Sin embargo, se encontró que la supresión o el reemplazo del aminoácido C-terminal afecta de una forma inesperada a la potencia del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano en el contexto del análogo de péptido de conotoxina **Ia**. De una forma específica, tal como se muestra en la tabla 8, cuando el Tyr en la posición 13 fue reemplazado por un Phe (análogo de péptido de conotoxina **II**) o por un D-Tyr (análogo de péptido de conotoxina **Im**), se redujo la potencia. Se midieron las IC_{50} de los análogos de péptidos de conotoxina **II** y **Im**, y fueron de 11 ± 1.4 nM y de 50 ± 1.2 nM, respectivamente. Por el contrario, cuando se suprimió el Tyr en la posición 13 (análogo de péptido de conotoxina **Iq**), fue sustituido por un N-Me-Tyr (análogo de péptido de conotoxina **Ir**), fue sustituido por un D-Arg (análogo de péptido de conotoxina **Is**), fue sustituido por un N-Me-D-Tyr (análogo de péptido de conotoxina **It**), fue sustituido por un beta-Tyr (análogo de péptido de

conotoxina **lu**) o fue sustituido por N-Me-Arg (análogo de péptido de conotoxina **lv**), este proporcionó análogos de péptidos de conotoxina con potencias más bajas en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano.

Se evaluó el impacto de la supresión del residuo de aminoácido en la posición 13 de los análogos de péptidos de conotoxina con un puente de triazol formado entre las posiciones 3 y 12 sobre su potencia en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano en relación con el impacto de la supresión del residuo en la posición 13 del CSP-4-OH (el análogo de péptido de conotoxina correspondiente con un puente de disulfuro en las posiciones 3 y 12). De una manera inesperada, con respecto al CSP-4-OH (puente de disulfuro Cys3, 12), la supresión de Tyr en la posición 13 dio como resultado una reducción mayor de 20 veces en la afinidad de enlace para el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano (figura 5A). Sin embargo, con respecto al análogo de péptido de conotoxina **1a** (reemplazo con un puente de triazol entre las posiciones 3 y 12), la supresión del aminoácido 13 dio como resultado una pérdida de actividad de aproximadamente 10 veces en el canal de la rata y una pérdida de actividad mayor de 100 veces en el canal humano (análogos de péptidos de conotoxina **1a** vs **1q**) (tabla 8, figura 5B). Estos datos mostraron que la supresión de un aminoácido en el término C (posición 13) disminuyó las actividades de los análogos de péptidos de conotoxina con un puente de triazol entre las posiciones 3 y 12, pero no para aquellos con un puente de disulfuro entre las posiciones 3 y 12. Estos datos sugirieron que las interacciones a lo largo del bucle 2 y del término carboxilo del péptido son importantes para determinar la potencia del canal humano en el contexto de un mimético de disulfuro estabilizado, y que los cambios en la estructura secundaria del bucle 2 y del término carboxilo crean interacciones impredecibles entre los análogos de péptidos de conotoxina RgIA y el nAChR $\alpha 9\alpha 10$.

Más aún, la adición de un aminoácido adicional en el término C del análogo de péptido de conotoxina **la** (por ejemplo, un N-Me-Gly, D-Tyr, o N-Me-Tyr) para proporcionar los análogos de péptidos de conotoxina **ln**, **lo**, y **lp** de 14 residuos, mantuvo su potencia en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. Como se ilustra en la tabla 8, por ejemplo, se midieron las IC_{50} de los análogos de péptidos de conotoxina **ln** (un N-Me-Gly adicional en la posición 14 en comparación con el **la**), **lo** (un D-Tyr adicional en la posición 14 en comparación con el **la**) y **lp** (un N-Me-Tyr adicional en la posición 14 en comparación con el **la**), y fueron de 37 ± 15 nM, 59 nM y 26 ± 1.4 nM, respectivamente.

Selectividad de enlace de canal: En una evaluación de los posibles efectos fuera del objetivo que implicaban a 88 receptores, transportadores, enzimas y cinasas, los análogos de péptidos de conotoxina que contenían triazol **la'** y **lb'** no demostraron efectos fuera del objetivo en 10 μ M, con la excepción de la inhibición parcial (52 % y 56 %, respectivamente) del nAChR $\alpha 7$. A este respecto, la sustitución del puente de disulfuro con el puente de triazol en el péptido de conotoxina RgIA no alteró de una forma significativa la selectividad de los análogos de péptidos de conotoxina.

6.5.1.2. La PEGilación del análogo de péptido de conotoxina **la en el término N retiene de una manera inesperada una actividad adecuada en los nAChR tanto de rata como humanos**

La adición de un valerato-PEG lineal de 30 kDa (acilación N-terminal) al término N del análogo de péptido de conotoxina **la** dio como resultado el análogo de péptido de conotoxina PEGilado **IIa**. Cuando se evaluó su actividad contra los nAChR humanos y de rata, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado

Ila produjo un bloqueo similar sobre los nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de rata y humanos (figura 6A y figura 6B) con bajas potencias nanomolares. En el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Ila** dio como resultado una IC_{50} casi idéntica (tabla 9; 0.7 ± 0.1 nM) a la del análogo de péptido de conotoxina **Ia** no conjugado (0.7 ± 0.03 nM). En contraste con la literatura que enseña que la PEGilación podría crear potencialmente una restricción estructural que daría como resultado una reducción de la potencia de enlace del péptido a los canales humanos y de roedores (Fishburn, 2008, J. Pharm. Sci. 97: 4167-4183; Parrott y DeSimone, 2011, Nat. Chem. 4: 13-14), el análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Ila** con un aumento de peso molecular de aproximadamente 18.5 veces por medio de la unión al polímero de PEG de una forma inesperada retuvo la potencia del péptido de conotoxina **Ia** (0.7 ± 0.1 nM en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano).

Tabla 9. Inhibición de los receptores de acetilcolina nicotínicos $\alpha 9\alpha 10$ de rata y humanos (nAChR) por medio del análogo de péptido de conotoxina **Ia** y sus análogos de péptidos de conotoxina PEGilados **Ila**, **IIIa**, **IVa**, **Va** y **VIa**

Péptido de conotoxina / análogo	$\alpha 9\alpha 10$ nAChR IC_{50} (nM)	
	Rata	Humano
RglA	2.4 ± 0.7	$> 10,000$
CSP-4-OH	1.5 ± 0.5	0.9 ± 0.6
CSP-4-NH2	0.4 ± 0.2	3.5 ± 1.5
Ia	14.3 ± 1.8	0.7 ± 0.03
Ia'	7.7 ± 0.7	26 ± 4
Ila	NT	0.7 ± 0.1
IVa	NT	100
Va	NT	~ 300
VIa	NT	300

Nota: NT = No probado.

Se evaluó el impacto de la PEGilación en diferentes posiciones de unión por medio de la prueba de las actividades de los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados **Va** (en los que un polímero de mPEG lineal se une de una forma covalente al término C del análogo de péptido de conotoxina **Ia**) y **VIa** (en donde

un polímero de mPEG lineal se une de una forma covalente a la arginina en la posición 7 del análogo de péptido de conotoxina **1a**) contra el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. Se observó una IC_{50} sustancialmente más baja contra el nAChR humano para los dos análogos de péptidos de conotoxina PEGilados **Va** ($IC_{50} = \sim 300$ nM) y **Vla** ($IC_{50} = 300$ nM), en comparación con la de los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados **Ila** ($IC_{50} = 0.7 \pm 0.1$ nM), que tienen un polímero de mPEG lineal unido de una forma covalente al término N del análogo de péptido de conotoxina **1a**. La conjugación con el PEG en el término C (**Va**) o en la posición 7 (**Vla**) del análogo de péptido de conotoxina **1a** no dio lugar a los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados con actividades adecuadas.

También se estudió la potencia de un análogo de péptido de conotoxina PEGilado con un enlazador diferente. Se probó la actividad del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Iva**, con un polímero de mPEG lineal unido al término N del análogo de péptido de conotoxina **1a** a través de un enlazador de butileno, contra el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. Como se muestra en la tabla 9, la IC_{50} del análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Iva** fue más de 100 veces superior ($IC_{50} = \sim 100$ nM) a la de los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados **Ila** ($IC_{50} = 0.7 \pm 0.1$ nM), en donde el polímero de PEG se une al término N del péptido (análogo del péptido de conotoxina **1a**) a través de un enlazador de valerato. Estos resultados ilustraron que la elección del tipo de enlazador y de la posición en el péptido al que se une el polímero de PEG puede ser crucial para la derivación de PEGilación del análogo de péptido de conotoxina **1a** con el fin de retener su potencia contra el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ humano. De una manera inesperada, se encontró que el análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Ila**, con un mPEG lineal de 30 kDa unido de una forma covalente al término N del análogo de péptido de conotoxina **1a** a través de un enlazador de valerato, es el análogo de péptido de conotoxina PEGilado óptimo.

También se demostró un resultado inesperado similar con el CSP-4-OH PEGilado. Con la adición de un PEG de 30 kDa en el término N del CSP-4-OH a través de un enlazador de valerato, el análogo de péptido de conotoxina PEGilado **XI** (mPEG-VA- CSP-4-NH₂ lineal de 30 kDa) mantuvo una baja potencia nanomolar en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de la rata ($IC_{50} = 6.0 \pm 0.1$ nM), lo que sugiere que los términos N de estos péptidos son permisivos para la adición de moléculas voluminosas sin que se altere de una forma significativa su potencia biológica *in vitro*.

6.5.2. Estudios de farmacocinética de los análogos de péptidos de conotoxina y los análogos de péptidos de conotoxina PEGilados en las ratas

Estudios de farmacocinética del análogo de péptido de conotoxina 1a en las ratas: El análogo de péptido de conotoxina **1a** se inyectó por la vía intravenosa o subcutánea en las ratas Sprague Dawley machos de 10 semanas de edad ($n = 3$ por grupo) en 1 mg por kg en el vehículo (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio al 0.8 %, Tween 20 al 0.05 %, pH de 6.0). La sangre se recolectó en varios puntos del tiempo (antes de la dosis y de 0.083 a 24 horas después de la dosis) a través de la vena de la cola en tubos de recolección de K₂ EDTA, se centrifugó, y el plasma se almacenó de -60 °C a -90 °C hasta el análisis. Las concentraciones del análogo de péptido de conotoxina **1a** se determinaron por medio de un ensayo de LC-MS/MS específico del péptido, tal como se describe a continuación. Se generaron los datos sin procesar y se graficaron por medio de una regresión no lineal con una respuesta a la dosis sigmoidal (pendiente

variable) con el GraphPad Prism. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon por medio del software PKSolver 2.0.

Análisis de LC-MS/MS para las muestras de PK de plasma del análogo de péptido de conotoxina 1a: Se llevaron a cabo los análisis de las muestras del análogo de péptido de conotoxina **1a** con un sistema de cromatografía de líquidos Shimadzu (Shimadzu UFLC-XR) y un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo AB Sciex API 5000. El sistema de HPLC consistió en un sistema de cromatografía de líquidos Shimadzu equipado con dos bombas LC-20AC XR, un módulo de comunicación CBM-20A, un muestreador automático SIL-20AC XR, un termostato de columna CTO-20A y un detector de UV SPD-20A en línea. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Thermo Scientific Fluophase PFP (2.1 x 50 mm, 5 μ m, 100 Å) a 40 °C. La fase móvil A fue de agua con ácido acético al 0.05 % y la fase móvil B fue de acetonitrilo con ácido acético al 0.05 %. A una velocidad de flujo de 0.3 mL por min, se aplicó un gradiente lineal de B (del 5 % al 90 %) durante 0 a 6 min, luego un 90 % durante 6.0 a 7.8 min y, a continuación, se regresó al 5 % de B durante 2 min para el equilibrado de la columna. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en el muestreador automático, y se inyectó un volumen de 5 μ L en el sistema de HPLC para cada análisis.

La detección espectrométrica de masas se llevó a cabo en un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo API 5000) equipado con una fuente de pulverización de iones turbo operada en el modo de ionización negativa. Las condiciones de operación de MS se optimizaron de la siguiente manera: El voltaje de pulverización de iones se estableció en -4500 KV y la temperatura de la fuente se mantuvo a 500 °C; la energía de colisión se estableció en -35 V. Se utilizó nitrógeno como el gas de colisión. Las velocidades de flujo del gas de cortina, de la fuente de iones de gas 1 y gas 2 se ajustaron en 10, 40 y 40 L por min, respectivamente. La operación de la LC-MS/MS y el análisis de datos se llevaron a cabo a través del uso del software Analyst 2.1 (AB Sciex). Los datos de cuantificación se obtuvieron a través del uso del modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) de la transición del análogo de péptido de conotoxina **1a** a m/z 809.0 / 792.5.

Se hizo una curva estándar del análogo de péptido de conotoxina **1a** (de 10 a 5000 ng por mL) en plasma de rata con K₂ EDTA (Bioreclamation) a partir de una solución de suministro de 1.0 mg por mL del péptido pesado con precisión y con la pureza corregida en DMSO a través del uso de un dosificador digital HP D300 (Tecan). 50 μ L del plasma de muestra de PK, de los estándares del análogo de péptido de conotoxina **1a**, y de las muestras de QC del análogo de péptido de conotoxina **1a**, se aplicaron en alícuotas sobre una placa de eliminación de fosfolípidos Phree (Phenomenex), se trataron con 450 μ L de metanol (dilución a 1: 10) y se mezclaron por completo. A continuación, las muestras se filtraron a través de la placa Phree en una placa de muestras de 96 pozos profundos con un colector de vacío y se analizaron a través del uso de los métodos de LC-MS/MS que se describieron. La concentración del análogo de péptido de conotoxina **1a** se derivó a partir de la curva estándar a través del uso de una regresión no lineal de un parámetro con el software AB-Sciex MultiQuant, y se calcularon los parámetros de PK a través del uso del software PKSolver 2.0.

Estudios de farmacocinética (PK) del análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa en las

ratas: El análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Ila** se inyectó por la vía intravenosa (“IV”) o subcutánea (“SC”) en las ratas Sprague Dawley machos de 10 semanas de edad (n = 3 por grupo) en 1 mg por kg (contenido de péptido central, ~ 19 mg por kg de contenido de péptido PEGilado) en el vehículo (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio al 0.8 %, Tween 20 al 0.05 %, pH de 6.0). La sangre se recolectó en varios puntos del tiempo (antes de la dosis y de 0.083 a 120 horas después de la dosis) a través de la vena de la cola en tubos de recolección de K₂ EDTA, se centrifugó, y el plasma se almacenó de -60 °C a -90 °C hasta el análisis. La cantidad del análogo de péptido de conotoxina **Ila** se cuantificó por medio de un ensayo ELISA específico del PEG-conjugado, tal como se describe a continuación. Las concentraciones en plasma derivadas (péptido neto) se generaron a través del uso de una regresión no lineal con una respuesta a la dosis sigmoidal (pendiente variable) con el GraphPad Prism. Los parámetros de PK se calcularon a través del uso del software PKSolver 2.0.

Anticuerpos, reactivos y métodos de ELISA para el análisis de muestras de PK del análogo de péptido de conotoxina PEGilado Ila: Los anticuerpos de captura policlonales de conejo anti-conopéptidos se generaron por medio de la inmunización de los conejos NZW sin tratamiento previo, con el análogo de péptido de conotoxina **Ia** conjugado con una proteína portadora de KLH, y se reforzaron con el análogo de péptido de conotoxina **Ia**. A continuación, los anticuerpos de IgG policlonales se purificaron a partir del suero inmunitario a través del uso de una columna de gravedad de proteína G y Sepharose de afinidad (GE Healthcare Life Sciences), seguido de pulido e intercambio de reguladores del pH en una columna de cromatografía de exclusión de tamaños (SEC, por sus siglas en inglés) 16/600 Superdex 75pG (GE Healthcare Life Sciences) a través del uso de PBS como la fase móvil. Las fracciones de la SEC que contenían el anticuerpo purificado se agruparon, y las concentraciones se calcularon por medio del ensayo de ácido bicinonínico (ensayo de BCA). Se ha demostrado que los anticuerpos policlonales purificados tienen una reactividad cruzada para reconocer el análogo de péptido de conotoxina **Ia** y el análogo de péptido de conotoxina **Ila**. Los pozos de la placa de microtitulación se recubrieron con 50 µL por pozo del anticuerpo de captura (análogo de péptido anti-conotoxina purificado **Ia** 7626R pAb, lote # 26R-1-D54-0618, 5 µg por mL) en el regulador de recubrimiento (NaHCO₃ 0.1 M, pH de 9.6) durante 12 h a 4 °C o a 37 °C con agitación durante 1 h, y luego se bloquearon con 200 µL por pozo de BSA al 5% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras de plasma, las muestras de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés) y los estándares (50 µL) se cargaron por duplicado y se incubaron durante 1.5 a 2 h a temperatura ambiente con agitación, seguido de la adición de 50 µL por pozo del anticuerpo anti-PEG (1 µg por mL) en el regulador diluyente (BSA al 0.5 % en PBS) durante 1 h adicional a temperatura ambiente con agitación. Se añadieron a la placa 50 µL por pozo de estreptavidina HRP diluida a 1: 200 en el regulador diluyente, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación, seguido de la adición de 50 µL del sustrato cromogénico (TMB) que se incubó a temperatura ambiente durante 5 a 6 min. La reacción se detuvo con 100 µL de H₂SO₄, y se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de placas de ELISA. Las placas se lavaron 3 veces con el regulador de lavado (PBST, pH de 7.4, que contenía Tween 20 al 0.1 % (v/v)), y luego de 3 a 6 veces con PBS después de cada paso. Como una referencia para la cuantificación, se estableció una curva estándar por medio de una dilución en serie del análogo de péptido de conotoxina

PEGilado **Ila** en plasma con EDTA K₂ al 10 % (de rata o mono) (de 400 ng por mL a 0.06 ng por mL, peso basado en el contenido de péptido central). La cantidad de análogo de péptido de conotoxina PEGilado **Ila** en cada muestra se cuantificó por medio de la extrapolación de la señal de la muestra al rango lineal (señal frente a concentración) de la curva estándar.

Resultados: Como se discute a continuación, se demostró que la PEGilación del análogo de péptido de conotoxina **Ia** prolongaba su tiempo de circulación. Se evaluó el perfil farmacocinético del péptido de conotoxina PEGilado **Ila** en las ratas, y se comparó con el perfil PK y la eliminación del análogo de péptido de conotoxina **Ia**. En la figura 7A y en la figura 7B se muestran las gráficas de las concentraciones promedio del análogo de péptido de conotoxina **Ia** y del péptido de conotoxina PEGilado **Ila** frente al tiempo en el plasma después de una dosis única de 1 mg por kg IV o SC. Dos mejoras debidas a la PEGilación fueron claras cuando se hizo la comparación del perfil PK del conjugado con PEG con el perfil del análogo de péptido de conotoxina **Ia** no conjugado solo: (i) la vida media del análogo de péptido de conotoxina **Ia** aumentó sustancialmente por medio de la adición de un grupo PEG, y (ii) la exposición total del péptido de conotoxina PEGilado **Ila** fue mucho mayor que la del análogo de péptido de conotoxina **Ia** no conjugado. Para los compuestos administrados por la vía SC, la vida media de eliminación del péptido de conotoxina PEGilado **Ila** fue aproximadamente 42 veces mayor que la del análogo de péptido de conotoxina **Ia** no conjugado (21 h frente a 0.5 h, respectivamente). También se mejoraron la C_{max} y la AUC para el péptido de conotoxina PEGilado **Ila**, en donde la C_{max} del péptido de conotoxina PEGilado **Ila** fue casi cuatro veces mayor que la del análogo de péptido de conotoxina **Ia** no conjugado, y en donde la AUC del péptido de conotoxina PEGilado **Ila** fue casi 140 veces mayor que la AUC del análogo de péptido de conotoxina **Ia** (C_{max}: Péptido de conotoxina PEGilado **Ila**: 2518 ng por mL; análogo de péptido de conotoxina **Ia**: 648 ng por mL) (AUC_{0-t}: Péptido de conotoxina PEGilado **Ila**: 137729 ng por mL * h; análogo de péptido de conotoxina **Ia**: 981 ng por mL * h). Los parámetros farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) para el análogo de péptido de conotoxina **Ia**: y el péptido de conotoxina PEGilado **Ila** en las ratas se muestran en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) para el análogo de péptido de conotoxina **Ia**: y el péptido de conotoxina PEGilado **Ila** en las ratas

Parámetro	Análogo de péptido de conotoxina Ia	Análogo de péptido de conotoxina PEGilado Ila
Potencia <i>in vitro</i> (α9α10 humano TEVC)	0.7 nM	0.7 nM
PK (Rata, SC - 1 mg por kg) C _{max}	648 ng por mL	2518 ng por mL
PK (Rata, SC - 1 mg por kg) C _{final}	20 ng por mL	166 ng por mL

Parámetro	Análogo de péptido de conotoxina Ia	Análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa
PK (Rata, SC - 1 mg por kg) Tmax	0.25 h	24 h
PK (Rata, SC - 1 mg por kg) Tfinal	3 h	120 h
PK (Rata, SC - 1 mg por kg) AUC	981 ng por mL * h	137729 ng por mL * h
PK (Rata, SC - 1 mg por kg) T1/2	0.5 h	21 h
PD (Rata CIPN) Dosis requerida para alcanzar la máxima eficacia	0.5 mg por kg (péptido neto)	0.5 mg por kg (péptido neto)
PD (Rata CIPN) Duración del efecto PD	4-24 h	48-72 h
Estabilidad metabólica (dosis SC de rata, % de péptido intacto que permanece en Tmax en relación con la pérdida de Tyr13)	66 % (porcentaje de péptido intacto a las 0.25 h)	82 % (porcentaje de péptido intacto a las 104 h)

También se observó en los monos una mejora del perfil de PK por medio de la PEGilación del análogo de péptido de conotoxina Ia. A los monos macacos cinomolgos machos se les administró el péptido de conotoxina PEGilado IIa en 1 mg por kg (concentración de péptido neto) por las vías IV y SC para un estudio de PK. Después de la administración IV, la exposición más alta del péptido de conotoxina PEGilado IIa fue a las 0.083 h después de la dosis con una Cmax de 42,200 ng por mL, y disminuyó hasta 109 ng por mL a las 168 h después de la dosis. La AUC fue de 603,594 ng por mL * h. Después de la administración SC, la exposición más alta del péptido de conotoxina PEGilado IIa fue a las 24 h después de la dosis con una Cmax de 7,867 ng por mL, y disminuyó hasta 216 ng por mL a las 168 h después de la dosis. La AUC fue de 453,077 ng por mL * h y la biodisponibilidad del péptido de conotoxina PEGilado IIa después de la dosificación SC fue del 75 %. Los perfiles y parámetros de PK para el péptido de conotoxina PEGilado IIa en los monos se muestran en la figura 8 y en la tabla 11.

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos del péptido de conotoxina PEGilado **Ila** después de la administración de una sola dosis de 1 mg por kg (IV o SC) en los monos

Parámetro		Unidad	Péptido de conotoxina PEGilado Ila 1 mg por kg IV	Péptido de conotoxina PEGilado Ila 1 mg por kg SC
Concentración máxima en el plasma	$C_{\max}$	ng por mL	41764	7867
Última concentración en el plasma	C_{final}	ng por mL	109	101
Tiempo de concentración máxima en el plasma	$T_{\max}$	h	0.083	24
Tiempo de la última concentración en el plasma	T_{final}	h	168	216
Vida media de eliminación	$T_{1/2}$	h	28.3	29.8
Área bajo la curva	AUC_{0-t}	ng por mL * h	599144	448716
AUC extrapolada al infinito	$AUC_{0-\text{obs inf}}$	ng por mL * h	448716	453077
Biodisponibilidad	F	%	NT	87

Nota: NT = No probado.

6.5.3. Actividad analgésica en modelos de dolor de animales

El modelo de lesión por constricción crónica (CCI, por sus siglas en inglés) es un modelo de mononeuropatía inducida por ligadura al nervio ciático (Bennett y Xie, 1988, Pain, 33 (1): 87-107). Se implica el daño a los nervios periféricos, con la infiltración de mastocitos, granulocitos, macrófagos y linfocitos T. Estas células, a través de la secreción de los mediadores inflamatorios (por ejemplo, citocinas y quimiocinas proinflamatorias), pueden contribuir a la generación y el mantenimiento del dolor neuropático. El CCI es uno de los modelos comunes para la lesión del nervio periférico.

Ensayo: Las ratas Sprague Dawley machos se anestesiaron en una cámara de inducción a través del uso de isoflurano al 5 % (O_2 a 1 L por min) en el día 0. Una vez que se hubo alcanzado el plano anestésico apropiado, se administró un flujo constante de isoflurano en un nivel de mantenimiento del 3 %

por el cono de la nariz. Se realizó una incisión de la piel de 2 cm en la pierna trasera izquierda paralela al fémur. Se expuso el nervio ciático, y próximas a la trifurcación del nervio ciático, se ataron cuatro ligaduras sueltas de intestino crómico 4-0 a aproximadamente 1 mm de distancia entre sí. Se cerraron el músculo y la piel, y se permitió la recuperación de los animales. A partir del día de la cirugía y diariamente durante 14 días después, se administraron 0.1 mg por kg de análogo de péptido de conotoxina **1b'** en un vehículo compuesto de fosfato de sodio 10 mM, NaCl al 0.8 %, y Tween 20 al 0.05 % por medio de una inyección subcutánea.

Resultados: Los datos de los animales tratados con el análogo de péptido de conotoxina **1b'** se compararon con aquellos de los animales tratados con el control de vehículo. La hiperalgesia mecánica se midió en la pata trasera izquierda (n = 3 veces) a través del uso de un Analgesímetro Ugo Basile a los 7 y 14 días después de la cirugía. El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de ANOVA bidireccional. Como se muestra en la figura 9, el tratamiento diario con 0.1 mg por kg del análogo de péptido de conotoxina **1b'** dio lugar a una mejora estadísticamente significativa en los umbrales de retirada de la pata en relación con los animales de control tratados con vehículo en los dos días de la medición. Estos datos indicaron que un análogo de RgIA sustituido por triazol trató con eficacia el dolor neuropático en el modelo de CCI de la rata.

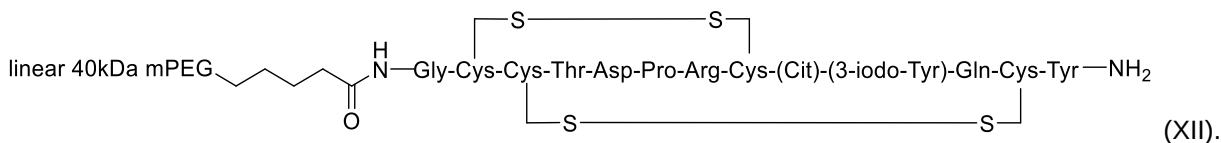
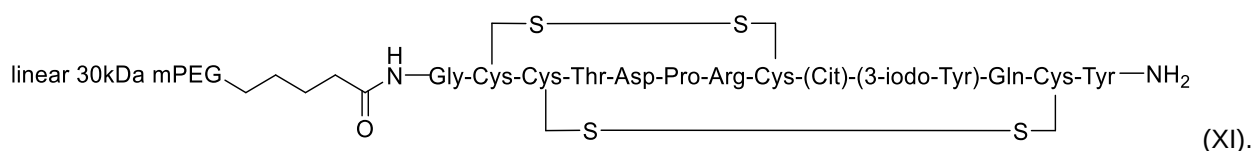
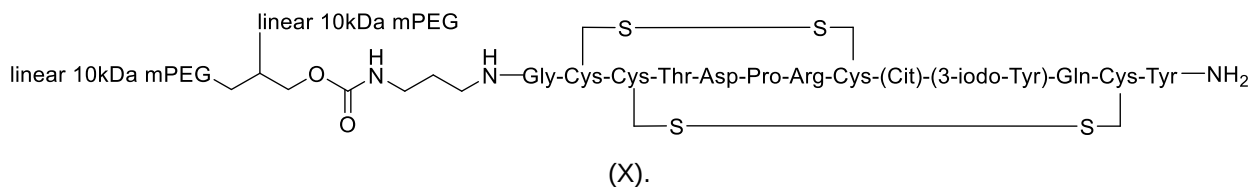
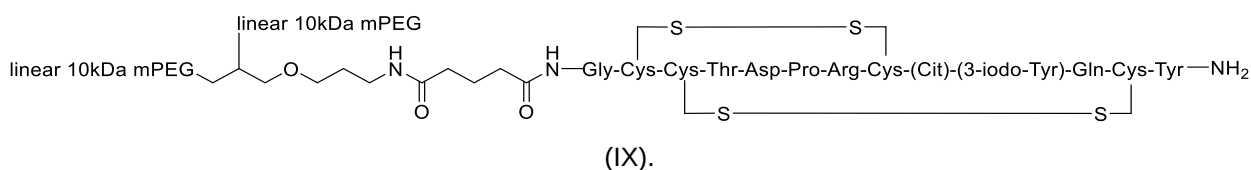
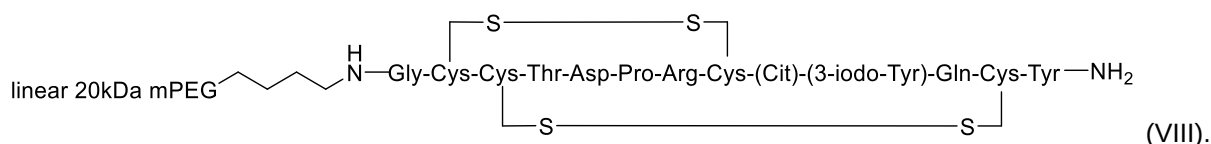
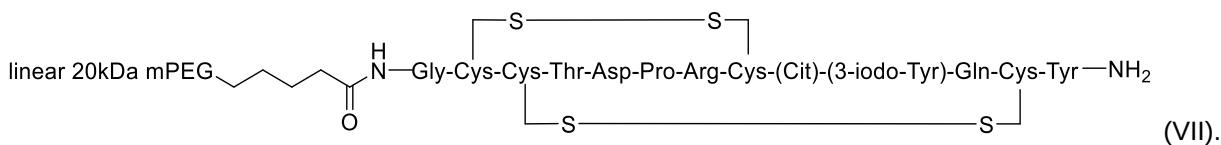
6.5.4. Modelo de neuropatía periférica inducida por quimioterapia

Ensayo: La neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN, por sus siglas en inglés) es común en los pacientes que se someten a quimioterapia con sales de platino. La neuropatía inducida por quimioterapia en las ratas Sprague Dawley machos fue inducida por medio del tratamiento con 2.4 mg por kg de oxaliplatino intravenoso (i.v.) dos veces por semana durante 3 semanas (6 inyecciones intravenosas). Los umbrales nociceptivos en las ratas se determinaron con un analgesímetro (Ugo Basile, Varese, Italia). Brevemente, se aplicó una presión en constante aumento a una pequeña área de la superficie dorsal de la pata trasera a través del uso de una sonda cónica roma. La presión mecánica se aumentó hasta que se produjo la vocalización o un reflejo de retirada. Los umbrales de vocalización o de reflejo de retirada se expresaron en gramos. Para las medidas de analgesia, la aplicación de presión mecánica se detuvo a 120 g. A lo largo de todo el período del estudio, los experimentadores fueron cegados en cuanto a la identidad de los compuestos inyectados. Los datos se analizaron con un ANOVA unidireccional por medio de la prueba de comparación múltiple de Dunnet (GraphPad Prism). El dolor neuropático se midió en el día 14 después de la administración de una sola dosis subcutánea (por ejemplo, de 0.5 mg por kg) del análogo de péptido de conotoxina.

6.5.4.1. Evaluación de los derivados del análogo de péptido de conotoxina PEGilado con diferentes polímeros de PEG

Se prepararon diferentes derivados PEGilados de CSP-4-NH₂, los cuales incluyeron MPEG-VA-CSP-4-NH₂ lineal de 20 kDa (análogo de péptido de conotoxina PEGilado **VII**, fórmula (VII), SEQ ID NO: 87), MPEG-bAmina-CSP-4-NH₂ lineal de 20 kDa (análogo de péptido de conotoxina PEGilado **VIII**, fórmula (VIII), SEQ ID NO: 88), mPEG-amine-CSP-4-NH₂ ramificado de 2 x 10 kDa (análogo de péptido de conotoxina PEGilado, **IX**, formula (IX), SEQ ID NO: 89), mPEG-carbonato-CSP-4-NH₂ ramificado de 2 x

10 kDa (análogo de péptido de conotoxina PEGilado **X**, fórmula (X), SEQ ID NO: 90), mPEG-VA-CSP-4-NH₂ lineal de 30 kDa (análogo de péptido de conotoxina PEGilado **XI**, fórmula (XI), SEQ ID NO: 91) y mPEG-VA-CSP-4-NH₂ lineal de 40 kDa (análogo de péptido de conotoxina PEGilado **XII**, fórmula (XII), SEQ ID NO: 92).



Se evaluó la duración del efecto analgésico de varios derivados PEGilados de **CSP-4-NH₂** en el modelo de CIPN de rata. Los derivados PEGilados analizados variaron en tamaño (de 20 kDa a 40 kDa) y configuración (unidos de una forma covalente a los polímeros de PEG lineales o ramificados). Se determinaron la eficacia analgésica y la duración del efecto farmacodinámico en el modelo de CIPN de rata después de una sola dosis subcutánea de 4 µg por kg de CSP-NH₂-500, las conotoxinas PEGiladas **VII**, **VIII**, **IX**, **X**, **XI** y **XII**. La eficacia analgésica se probó a los 30 min, 5 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h después de la

dosificación. La hiperalgesia mecánica se midió por medio de la prueba de Randall-Selitto. Los umbrales de dolor disminuyeron a través del tiempo después de la administración IV de oxaliplatino dos veces por semana, en donde se indujo la hiperalgesia mecánica de una forma significativa para el día 7 después de la dosificación de oxaliplatino y continuó aumentando hacia el día 14. La eficacia del **CSP-4-NH2** y de los derivados de PEG del **CSP-4-NH2** en la reducción de la hiperalgesia mecánica se probó en el día 14. Las mediciones de hiperalgesia mecánica de Randall Selitto alcanzaron los niveles previos a la quimioterapia a partir de las 0.5 a 5 h posteriores a la administración del fármaco. La duración de la eficacia analgésica aumentó a medida que el peso molecular del PEG agregado aumentó hasta un PEG lineal de 30 kDa. La duración de la eficacia del CSP-4-NH2 PEGilado a través del uso del enlazador de n-butilo (**VIII**) fue significativamente más corta que la duración de la eficacia del CSP-4-NH2 PEGilado a través del enlazador de ácido valérico (**VII**), (**XI**), (**XII**) (figuras 10A a 10C). No se obtuvo ningún beneficio adicional por medio de la conjugación con una molécula de PEG mayor que un PEG lineal de 30 kDa (**XII**) o con un PEG de cadena ramificada (**IX** y **X**) (figura 10C).

6.5.4.2. Evaluación de la eficacia de los análogos de péptidos de conotoxina la y la' y del análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa

Como se muestra en la figura 11A, una sola dosis subcutánea (0.5 mg por kg) del análogo de péptido de conotoxina la' dio lugar a mejoras estadísticamente significativas en la hiperalgesia mecánica a las 0.5 h, 4 h y 24 h después de la dosis. Como se muestra en la figura 11B, la inyección subcutánea única del análogo de péptido de conotoxina la' dio como resultado una mejora estadísticamente significativa en la hiperalgesia mecánica a las 0.5 h, 4 h y 24 h después de la dosis en relación con los animales tratados con vehículo. La figura 11C muestra que la administración de una sola dosis de 0.5 mg por kg del análogo de péptido de conotoxina la o del o análogo de péptido de conotoxina PEGilado IIa a las ratas a los 14 días después de la inducción de la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino dio como resultado una reducción significativa de la hiperalgesia mecánica (hasta 4 h para el **la** o hasta 72 h para el **IIa**). Estos datos indicaron además el potencial terapéutico para el tratamiento o la prevención del dolor neuropático con estos derivados de RglA estabilizados con triazol.

7. Incorporación como referencia

Todas las referencias citadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad y para todos los propósitos en la misma medida que si cada publicación o patente o solicitud de patente individual fuera indicada de una forma específica e individual como incorporada por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Se pueden hacer muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Las modalidades específicas que se describen en el presente documento son ofrecidas a manera de ejemplo solamente, y la invención va a ser limitada solamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los cuales tienen derecho tales reivindicaciones.