

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 603**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/245 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 18215029 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023 EP 3492075**

54 Título: **Formulaciones combinadas de neosaxitoxina para una anestesia local prolongada**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361789054 P

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

13.06.2024

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER
CORPORATION (100.0%)
55 Shattuck Street
Boston, Massachusetts 02115, US**

72 Inventor/es:

**BERDE, CHARLES y
KOHANE, DANIEL S.**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 972 603 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones combinadas de neosaxitoxina para una anestesia local prolongada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a bloqueantes nerviosos mejorados y la infiltración de anestesia local y la analgesia sin aumento de la toxicidad, específicamente de las combinaciones de neosaxitoxina con bupivacaína, sola o en combinación con epinefrina, en dosis totales y de concentración específicas.

10

Antecedentes de la invención

Es deseable un agente de liberación no sostenida que proporcione de manera confiable de 6 a 12 horas de bloqueo nervioso de grado quirúrgico, seguido de hasta 48 horas de bloqueo menor y alivio del dolor sin tratamiento adicional. El primer período sería útil tanto durante la operación como en el período inmediatamente posterior a la misma; el último proporcionaría una analgesia decreciente y permitiría aumentar el uso de la parte del cuerpo afectada a medida que progresa la curación. Exparel™, el único anestésico local de duración prolongada del mercado, proporciona un bloqueo nervioso impredecible en los seres humanos, que alcanza su punto máximo 24 h después de la inyección, siendo el efecto anestésico inversamente proporcional a la dosis. Además, implica el uso de un sistema de liberación sostenida y causa lesiones locales e inflamación del tejido.

15

20

Consideraciones similares se refieren a micropartículas de bupivacaína + dexametasona, que podrían proporcionar una anestesia local de duración prolongada, aunque con un sistema de liberación sostenida y con una lesión tisular muy severa. El derivado de lidocaína cuaternario QX-314 podría proporcionar anestesia local de duración prolongada (aproximadamente 24 horas de duración), pero con lesiones tisulares locales muy severas y toxicidad sistémica.

25

Cuando se administran sobredosis o inyecciones intravasculares accidentales de anestésicos locales con aminoamida y amino-éster, se provoca una toxicidad cardiovascular que es notoriamente refractaria a la reanimación (Polaner et al. *Ped Anes* 2011; 21: 737-742; Fisher, et al., *Can. J. Anaesth.*, 1997; 44: 592-598; Butterworth, *Reg. Anesth. Pain Med.*, 2010; 35: 167-76). La toxicidad cardiovascular de la bupivacaína probablemente esté mediada por el canal de sodio cardíaco Nav1.5, que es relativamente más resistente a la unión e inactivación por los bloqueadores de los canales de sodio del sitio 1 (Clarkson, et al., *Anesthesiology*, 1985; 62: 396-405).

30

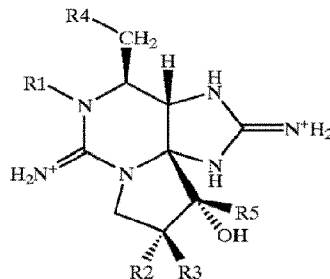
Las ficotoxinas neosaxitoxina, saxitoxina y gonyautoxina son compuestos activos producidos por la proliferación de algas dañinas de los géneros *Alexandrium sp.*, *Piridinium sp.* y *Gimnodinium sp.* (Lagos, *N. Biol. Res.*, 31: 375-386, 1998). En los últimos 15 años, se ha demostrado que estas ficotoxinas también pueden ser producidas por cianobacterias de agua dulce, como algas verde-azules fotosintéticas, además de ser producidas por dinoflagelados marinos.

40

Sólo se han identificado cuatro géneros de cianobacterias capaces de producir ficotoxinas paralizantes, produciendo en cada caso una mezcla diferente de ficotoxinas tanto en cantidad como en tipo de ficotoxina producida, es decir, producen diferentes perfiles de ficotoxinas paralizantes (Lagos, et al., 1999, *TOXICON*, 37: 1359 - 1373 (1999). Pereira, et al., *TOXICON*, 38: 1689 - 1702 (2000).

45

La estructura química de estas ficotoxinas tiene la estructura general (I) y su estructura particular está definida por los sustituyentes R1 a R5 de acuerdo con la siguiente tabla:



(I)

50

Compuesto	R1	R2	R3	R4	R5
Saxitoxina	H	H	H	COONH ₂	OH
Neosaxitoxina	OH	H	H	COONH ₂	OH
Gonyautoxina 1	OH	H	OSO ⁻³	COONH ₂	OH

Gonyautoxina 2	H	H	OSO ⁻³	COONH ₂	OH
Gonyautoxina 3	OH	OSO ⁻³	H	COONH ₂	OH
Gonyautoxina 4	H	OSO ⁻³	H	COONH ₂	OH
Gonyautoxina 5	H	H	H	COONHSO ⁻³	OH

Estas ficotoxinas paralizantes actúan como bloqueadores específicos de los canales de sodio dependientes del voltaje presentes en las células excitables (Kao, C.Y., Pharm. Rev., 18: 997-1049 (1966)). Debido a la inhibición de los canales de sodio, se bloquea la transmisión de un impulso nervioso y se evita la liberación de neurotransmisores al nivel de la unión neuromotora, lo que impide la contracción muscular. Debido a estos efectos fisiológicos, estos compuestos son potencialmente útiles en farmacología cuando se utilizan como inhibidores de la actividad muscular en patologías asociadas con hiperactividad muscular, tales como espasmos musculares y distonías focales, cuando se administran localmente en forma inyectable. Además, dado que se provoca un bloqueo del impulso nervioso al nivel de transmisión cuando estos compuestos se administran como infiltración local, no sólo son capaces de bloquear las vías de neurotransmisión eferentes, sino también bloquean las vías aferentes y causan una inhibición de las vías sensoriales, generando un efecto anestésico cuando se inyectan localmente. Este es un efecto sorprendente, ya que ambos efectos son simultáneos, como se describe en la Patente US nº 4.001.113.

Como se describe en la Patente US 6.326.020, de Kohane, et al., se han desarrollado combinaciones de bloqueadores de los canales de sodio del sitio 1 de origen natural, como tetrodotoxina (TTX), saxitoxina (STX), descarbamoilsaxitoxina y neosaxitoxina, junto con otros agentes, para proporcionar un bloqueo de larga duración con características mejoradas, incluyendo seguridad y especificidad. En una realización, la duración del bloqueo se prolonga en gran medida combinando una toxina con un anestésico local, vasoconstrictor, glucocorticoide y/o un fármaco adrenérgico, ambos agonistas alfa (epinefrina, fenilefrina) y agonistas alfa-2 periféricos centrales mixtos (clonidina) u otros agentes. Se puede conseguir un bloqueo nervioso prolongado empleando combinaciones de toxinas con vanilloides. Se proporcionaron intervalos de dosificación basados en estudios con tetrodotoxina y saxitoxina. Sin embargo, ahora se sabe que se deben realizar estudios con cada toxina para predecir las dosis efectivas, ya que dosis de un tipo de toxina no predicen la eficacia de otro tipo de toxina. Como se demuestra en los siguientes ejemplos, también se ha descubierto que, para determinar dosis seguras y eficaces en relación a estas toxinas, no se puede extrapolar de ratas u ovejas a humanos.

Los anestésicos locales convencionales se asocian con neurotoxicidad local en dosis clínicas y con toxicidad cardiovascular profunda en sobredosis. Si bien la incidencia general es baja, estudios han identificado también un adormecimiento prolongado y parestesias como complicaciones de la anestesia local y regional con anestésicos de amida. Esto se ha asociado a signos histológicos de lesión nerviosa química (Myers, et al., Anesthesiology, 1986; 64: 29-35; Kalichman, et al., J. Pharm. Exper. Therapeutics, 1989; 250 (1): 406-413). Es probable que estos riesgos de neurotoxicidad local aumenten aún más en el entorno donde se intenta el alivio prolongado del dolor mediante la administración de anestésicos locales convencionales por administración de liberación controlada (Padera, et al., Anesthesiology, 2008; 108: 921-928; Kohane and Langer, Chem. Sci., 2010; 1: 441-446) o por infusiones perineurales locales, en particular cuando se emplean concentraciones o dosis más altas durante períodos de tiempo largos. En dosis equipotentes de inyección intratecal, los bloqueadores de los canales de sodio del sitio 1 causan una mayor duración de la anestesia con menos evidencia histológica de neurotoxicidad en comparación con la bupivacaína (Sakura, et al., Anesth. Analg., 1995; 81: 338-346). En general, los enfoques para la anestesia local prolongada que implican bloqueadores de los canales de sodio del sitio 1 reducen los riesgos de lesión nerviosa en comparación con aquellos que implican la administración prolongada o repetida de amino-amidas o amino-ésteres convencionales.

Así, un objeto de la presente invención es proporcionar combinaciones específicas de neosaxitoxina con bupivacaína, opcionalmente con epinefrina, para proporcionar un alivio del dolor hasta dos o tres días después de una única inyección, combinaciones que son seguras y eficaces en humanos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar formulaciones para la anestesia local y la analgesia segura y eficaz en pacientes pediátricos.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar formulaciones para el tratamiento de indicaciones que requieren volúmenes altos, medios y bajos de anestesia local.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar formulaciones para tratar indicaciones que requieren diferentes tasas de recuperación del bloqueo sensorial o motor debido a la anestesia local.

Rodríguez-Navarro, et al., Neurotox. Res., vol. 16, n.º 4, 28 de julio de 2009, pp. 408-415 se refiere a un estudio de fase 1 que muestra que la combinación de neosaxitoxina y bupivacaína da como resultado una analgesia más prolongada en comparación con neosaxitoxina sola y bupivacaína sola.

El archivo de ClinicalTrials.gov, número de ensayo clínico nacional NCT01786655, 11 de febrero de 2013, se refiere a una propuesta para un estudio clínico de fase 1 en el que se usa neosaxitoxina sola, en combinación con bupivacaína (0,2%) o en combinación con bupivacaína (0,2%) y epinefrina (5 µg/ml).

Berde, et al., Marine Drugs, vol. 9, n.º 12, 15 de diciembre de 2011, pp. 2717-2728, se refiere a bloqueos nerviosos locales con combinaciones de tetrodotoxina y bupivacaína al 0,25% (2,5 mg/ml), con o sin epinefrina, en ratas.

5 La WO 98/51290 A2 describe bupivacaína en combinación con tetrodotoxina, saxitoxina o un derivado de saxitoxina.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones.

10 Se realizaron estudios para identificar las dosis de neosaxitoxina ("NeoSTX") y bupivacaína, solas o en combinación con epinefrina, que proporcionan hasta dos o tres días de alivio del dolor. Los estudios que utilizaron un bloqueo percutáneo del nervio ciático en ratas demostraron que 1) las combinaciones bupivacaína-NeoSTX no aumentan la toxicidad sistémica en comparación con NeoSTX sola; 2) las combinaciones de bupivacaína-NeoSTX producen un bloqueo más confiable y un bloqueo de mayor duración en comparación con NeoSTX sola; y 3) la triple combinación de NeoSTX-bupivacaína-epinefrina produce una anestesia local más prolongada que la combinación doble de NeoSTX-bupivacaína. La adición de epinefrina a esta combinación de NeoSTX-bupivacaína prolonga dramáticamente la duración del bloqueo total a un estímulo mecánico.

20 Estudios en ratas y ovejas demostraron que NeoSTX no produce cardiotoxicidad, incluso si se inyecta vía intravenosa. Sin embargo, no es posible determinar las dosis eficaces en seres humanos, adultos o pediátricos, despiertos o no, utilizando estudios en animales, dado que los limitados efectos secundarios que se pueden determinar en seres humanos y en casi todos los animales.

25 Estas combinaciones de 2 y 3 componentes utilizan interacciones aditivas o sinérgicas para mejorar la eficacia, mientras que los efectos tóxicos de las combinaciones son menos que aditivos, lo que mejora el margen general de seguridad y eficacia. En base a estos efectos inesperados sobre la eficacia, en estudios en ratas y humanos, la concentración de bupivacaína seleccionada, del 0,2%, es inferior a las concentraciones de bupivacaína comercial estándar, del 0,25%, 0,5% o 0,75%.

30 Los estudios de Fase 1 en humanos se realizaron con un investigador iniciado IND con la aprobación de la FDA e IRB. El estudio demostró que las combinaciones de NSTST-bupivacaína, solas o en combinación con epinefrina, en diferentes proporciones, para diferentes indicaciones clínicas, proporcionan una mejora clínicamente importante de la eficacia, la duración del alivio del dolor y la seguridad de la anestesia local en comparación con el estándar, la bupivacaína. Los resultados demostraron:

35 1. Las combinaciones NeoSTX-bupivacaína al 0,2%, incluso con dosis de NeoSTX tan bajas como 5 a 10 µg (concentraciones de 0,5 a 1 µg/ml), e incluso sin epinefrina, prolongan el bloqueo en comparación con la bupivacaína estándar aproximadamente 4 veces (figuras 7 y 8).

40 2. La NeoSTX sola, es decir, disuelta en solución salina normal, es ineficaz e inconsistente en dosis tolerables, por lo que los datos en humanos apoyan firmemente la necesidad de la combinación NeoSTX-bupivacaína (Figuras 7 y 8)

45 3. La epinefrina reduce los síntomas sistémicos, ampliando así el margen de seguridad, prolonga la duración del bloqueo denso (adecuado para la anestesia quirúrgica) y prolonga aún más la duración del analgésico (por ejemplo de 48 a 72 horas) (Figura 8). Esto permite la dosificación en aplicaciones de gran volumen, que recientemente se han utilizado ampliamente para la infiltración de heridas en cirugías de cadera y rodilla (más de 100 ml resulta rutinario) y grandes cirugías abdominales.

50 4. Los efectos secundarios (hormigueo, vómitos, náuseas) limitan la dosis tolerable de NeoSTX-bupivacaína en pacientes despiertos a menos de 40 µg de NeoSTX, aunque dosis más altas deberían ser seguras en pacientes bajo anestesia general. Señalar que estos efectos secundarios limitados se observaron con NeoSTX-salino y NeoSTX-bupivacaína, no con NeoSTX-bupivacaína-epinefrina.

55 Ahora se han identificado volúmenes específicos y concentraciones de los componentes que mejorarán la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia en situaciones clínicas específicas. Estos descubrimientos llevaron a estudios para desarrollar las siguientes formulaciones de dosificación combinada:

60 Una formulación de dosificación para un uso con gran volumen de 35 a 120 ml para humanos adultos y 0,5 a 1,8 ml/kg para niños, incluye como agentes activos una triple combinación de bupivacaína en un rango de concentración entre 0,1% (1 mg/ml) y 0,25% (2,5 mg/ml), siendo la dosis sistémica total de bupivacaína no superior a 225 mg en adultos o 2,5 mg/kg en niños; NeoSTX en un rango de concentración de 0,1 µg/ml - 1 µg /ml, siendo la dosis sistémica total de 3,5 - 100 µg en adultos o 0,05 - 1,5 µg/kg en niños, y epinefrina en un rango de concentración de 2 µg /ml (1:500.000 en la terminología común) y 10 µg/ml (1:100.000). El uso común de esta formulación sería para la infiltración de tres o cuatro capas de una gran herida quirúrgica para una laparotomía abierta de longitud completa, incisión toracoabdominal o incisión en el flanco. Algunas de estas operaciones incluyen: parto por cesárea,

histerectomía abierta, esófago-gastrectomía, nefrectomía o cirugías de cáncer abdominal grande, como colectomías. La infiltración de heridas para el reemplazo total de cadera (artroplastia de cadera) y el reemplazo total de rodilla (artroplastia de rodilla) también serían usos ideales de estas formulaciones.

5 Una formulación de dosis para un uso de volumen medio de 15 a 50 ml incluye como agentes activos una combinación de bupivacaína en un rango de concentración de 0,125% - 0,3% (1,25 - 3 mg/ml), siendo la dosis sistémica en adultos de no más de 100 mg (no más de 2 mg/kg en niños), NeoSTX en un rango de concentración de 0,2 a 2 µg/ml, siendo la dosis sistémica en adultos de 7 a 150 µg (0,1 a 1,5 µg/kg en niños) y epinefrina en un rango de concentración de desde 0-10 µg /ml ($\leq 1:100.000$).

10 Muchos de los usos previstos para formulaciones de volumen moderado implican tanto el bloqueo de nervios periféricos o bloqueos del plexo (inyección perineural), como infiltración (inyección a lo largo de las capas de una herida quirúrgica). Los usos de esta formulación incluyen cirugía de hombro, brazo o mano, infiltración o bloqueo ilio-inguinal/ilio-hipogástrico para la reparación de la hernia inguinal, bloqueo del pene para la reparación de hipospadias, bloqueo femoral para el reemplazo total de rodilla o reparación del ligamento cruzado anterior, bloqueo del nervio intercostal para cirugía torácica abierta o bloqueo de los nervios femoral y ciático para la amputación de piernas. Para la cirugía de cadera, esto podría implicar un bloqueo del plexo lumbar y un bloqueo ciático de menor volumen. Esta formulación también podría usarse para bloqueos nerviosos (femoral y ciático, plexo lumbar y ciático) de la articulación de cadera o rodilla para la cirugía de reemplazo articular.

20 Para algunos de estos usos de volumen medio, en particular el bloqueo de nervios periféricos y de plexo, es altamente prioritario proporcionar tres características:

- 25 i) anestesia (insensibilidad casi completa) para la cirugía durante períodos de 3 a 12 horas,
- ii) analgesia (alivio prolongado del dolor) después de cirugía durante períodos de al menos 24 horas, mientras se asegura,
- 30 iii) recuperación del bloqueo motor para permitir cierta fuerza en el movimiento de la extremidad en un plazo de 24 a 48 horas.

35 Para el bloqueo de nervios periféricos y del plexo con efectos motores en brazos y piernas, en base al requisito de recuperación del bloqueo motor en 24 a 48 horas, las formulaciones con NeoSTX-bupivacaína sin epinefrina son ideales, como se detalla en las siguientes tablas.

40 Una formulación de dosificación para bajo volumen, larga duración, incluye como agentes activos una combinación de bupivacaína a una concentración de 0,25% - 0,5% (2,5 - 5 mg/ml), donde 5 - 15 ml dan una dosis de bupivacaína sistémica en adultos no superior a 75 mg, NeoSTX en un rango de concentración de 0,5 a 5 µg/ml, donde 5 a 15 ml da una dosis sistémica en adultos de 5 a 75 µg, y epinefrina en un rango de concentración de 2,5 a 10 µg/ml (1:500.000 - 1:100.000). Un ejemplo es el bloqueo simpático lumbar para el síndrome de dolor regional complejo/distrofia simpática refleja o insuficiencia vascular de la pierna o para el bloqueo del plexo celíaco en pancreatitis o cáncer de páncreas.

45 Es deseable que este tipo de bloqueo dure el mayor tiempo posible, ya que cuando se realiza empleando guía fluoroscópica en pequeños volúmenes, hay muy poco bloqueo sensorial o motor. Por tanto, se deben usar concentraciones relativamente altas de los tres componentes para esta aplicación con el fin de lograr duraciones de bloqueo simpático y un aumento del flujo sanguíneo local durante al menos 3 a 4 días, y posiblemente más. Otras aplicaciones que pueden involucrar este uso de bajo volumen y larga duración incluirían el bloqueo del nervio ciático de duración prolongada, donde la recuperación rápida del motor no es un problema, como en el caso de la amputación de una pierna.

Breve descripción de las figuras

55 Figuras 1A-1F: muestran la dosis-respuesta en ratas de la intensidad del bloqueo del nervio ciático a los 15 minutos (efecto máximo) con NeoSTX en solución salina y NeoSTX-bupivacaína. Las Figuras 1A-1F son gráficos de la intensidad del bloqueo después de la inyección del nervio ciático en ratas, como se describe en el Ejemplo 1, a los 15 minutos para las pruebas de Placa caliente, EPT y Von Frey en la extremidad posterior inyectada (Figuras 1A-1C) y la extremidad posterior contralateral (Figura 1D-1F), comparando la latencia de extracción de la extremidad (segundos) (1A, 1D); empuje postural extensor (g) (1B, 1E) y la fuerza para la extracción de la extremidad (g) (1C, 1F).

60 Figuras 2A-2F: muestran la duración del bloqueo ciático en ratas para NeoSTX en solución salina y NeoSTX-bupivacaína. Las Figuras 2A-2F son gráficas que muestran la duración del bloqueo después de la inyección ciática en ratas, como se describe en el Ejemplo 1, para la recuperación de Hotplate (horas) (2A, 2D), la recuperación de EPT (horas) (2B, 2E) y la recuperación de Von Frey (horas) (2C, 2E) ensayando la extremidad posterior inyectada (2A-2C) y la extremidad posterior contralateral (2D-2F).

Figura 3: muestra que la adición de bupivacaína reduce la toxicidad sistémica de NeoSTX (aumenta la LD50). NeoSTX 4 y NeoSTX 5 se refieren a dos formulaciones diferentes preparadas en diferentes instalaciones de fabricación con un año de diferencia. La Figura 3 es un gráfico de las curvas LD50 (en microgramos) de 2 formulaciones de NeoSTX, Neo 4 (líneas a la izquierda del gráfico) y Neo 5 (líneas a la derecha del gráfico), con y sin bupivacaína, en base a datos en ratas.

Figuras 4A-4C: muestran que la duración de los bloqueos es más larga con NeoSTX-bupivacaína-epinefrina, intermedias con NeoSTX-bupivacaína y más cortas con bupivacaína sola. Las Figuras 4A-4C son gráficas de las pruebas de Von Frey en ratas a lo largo del tiempo con bupivacaína al 0,2% (Figura 4A), bupivacaína al 0,2% más 3 µg de NeoSTX/kg (Figura 4B) y bupivacaína al 0,2% más 3 µg de NeoSTX/kg más 5 µg epinefrina/kg (Figura 4C).

Figuras 5A y 5B: muestran que la adición de bupivacaína a NeoSTX mejora la confiabilidad y la duración del bloqueo en comparación con NeoSTX-salino, medida por bloqueo del nervio ciático en la rata. La adición de epinefrina a NeoSTX-bupivacaína produce una prolongación adicional del bloqueo. Los resultados demuestran que NeoSTX en solución salina produce un inicio inconsistente y retardado del bloqueo sensorial mecánico y el bloqueo se recupera por completo a las 12 horas, incluso a una dosis de NeoSTX ligeramente más alta (3,5 µg/kg) que la utilizada en la Figura 5B (3 µg/kg). Las Figuras 5A y 5B son gráficos de los gramos de fuerza aplicados en la prueba de Von Frey con el tiempo, en horas, a la pata tratada para 3,5 µg de NeoSTX (triángulo) en comparación con el control (círculo) (Figura 5A) y como función de 0,2% de bupivacaína (círculo), 0,2% de bupivacaína y 3 µg de NeoSTX (cuadrado) o 0,2% de bupivacaína, 3 µg de NeoSTX y 5 µg de epinefrina/ml (triángulo) (Figura 5B). Las tres formulaciones producen un rápido inicio del bloqueo sensorial mecánico denso. Los gráficos demuestran que la adición de NeoSTX 3 µg/kg a bupivacaína al 0,2% produce una prolongación 4 veces mayor del bloqueo total (4 horas versus 1 hora) y una prolongación 6 veces mayor del bloqueo medio máximo (12 horas versus 2 horas). Los resultados demostraron que la adición de epinefrina 5 µg/kg a bupivacaína 0,2% + NeoSTX 3 µg/kg produce una prolongación adicional del bloqueo total de 6 veces (24 horas versus 4 horas) y una prolongación adicional de 2,5 veces la mitad del máximo bloqueo (30 horas versus 12 horas) en comparación con bupivacaína 0,2% + NeoSTX 3 µg/kg. En comparación con el estándar actual, la bupivacaína, la triple combinación de bupivacaína-NeoSTX-epinefrina da como resultado una prolongación de 24 veces el bloqueo completo y una prolongación de 15 veces el bloqueo medio máximo.

Figuras 6A y 6B: muestran que los síntomas sistémicos en el estudio de Fase I en humanos variaron con la dosis de NeoSTX y los síntomas se suprimieron en gran medida por la inclusión de epinefrina. La adición de combinaciones de epinefrina a NeoSTX-bupivacaína reduce dramáticamente la incidencia y la importancia clínica de los síntomas sistémicos a dosis de NeoSTX de 10 µg y 30 µg en humanos adultos en el ensayo de fase 1. La Figura 6A es un gráfico del porcentaje de sujetos que presentan síntomas sistémicos: hormigueo, entumecimiento, mareos, náuseas o vómitos en cualquier momento posterior a la administración de 0, 5, 10, 15, 20, 30 o 40 µg de NeoSTX-bupivacaína-epinefrina. Se observaron náuseas en el 80% de los sujetos con 40 µg de NeoSTX. La gráfica muestra que la aparición de síntomas sistémicos en cualquier punto de tiempo puntual para la combinación NeoSTX-bupivacaína-epinefrina a dosis de NeoSTX de 10 µg o 30 µg no se elevó por encima del placebo. La Figura 6B es un gráfico del porcentaje de sujetos que tienen síntomas sistémicos clínicamente significativos, es decir, puntuaciones superiores a 3 en una escala de 0-10 durante 30 minutos o más. La Figura 6B muestra que no hubo puntuaciones por encima de cero para los sujetos que recibieron dosis de 10 µg o 30 µg de NeoSTX-bupivacaína-epinefrina.

Figuras 7A y 7B: muestran los efectos de las combinaciones NeoSTX-bupivacaína y NeoSTX-bupivacaína-epinefrina sobre la intensidad y la duración del bloqueo en un estudio en Fase 1 en humanos con 10 µg de NeoSTX. Las Figuras 7 A, B y C son del Estudio de Fase 1 en humanos que muestra que la adición de epinefrina intensifica y prolonga el bloqueo de las combinaciones de bupivacaína-NeoSTX. Las Figuras 7A, 7B y 7C son gráficas de medida del umbral de bloqueo denso y parcial, detección mecánica (Figura 7A), dolor mecánico (Figura 7B) y detección de frío (Figura 7C) para NeoSTX, NeoSTX+bupivacaína, NeoSTX+bupivacaína+epinefrina, en comparación con placebo y controles (sin NeoSTX), con el tiempo, en horas. Los resultados demuestran que la bupivacaína al 0,2% produce un bloqueo denso durante no más de 6 horas y una analgesia parcial entre 6 y 12 horas. 10 µg de NeoSTX en solución salina proporciona un bloqueo altamente variable y de corta duración. 10 µg de NeoSTX en bupivacaína al 0,2% produce un bloqueo denso durante aproximadamente 12 horas y grados de analgesia durante 24 a 72 horas. 10 µg de NeoSTX en bupivacaína al 0,2% con epinefrina 5 µg/ml producen un bloqueo denso durante 24 horas y grados de analgesia durante 48 a 72 horas.

Figuras 8A-8C: muestran los efectos del aumento de la dosis de NeoSTX en las combinaciones NeoSTX-bupivacaína al 0,2%. Las Figuras 8A, B y C son del Estudio de Fase 1 en humanos que muestra que las combinaciones de NeoSTX-bupivacaína prolongan el bloqueo en relación con la bupivacaína sola a dosis tan bajas como de 5 µg. Las Figuras 8A-C muestran gráficas de medida de los bloqueos densos y parciales de detección mecánica (Figura 8A) y térmica (Figuras 8B, 8C) para la bupivacaína, NeoSTX-bupivacaína y NeoSTX-bupivacaína-epinefrina a una dosis 10 µg de NeoSTX. Los resultados muestran que las combinaciones de NeoSTX-bupivacaína al 0,2%, a todas las dosis de NeoSTX que varían de 5 µg a 40 µg, producen un bloqueo denso de múltiples modalidades sensoriales durante al menos 12 horas, analgesia durante períodos de 24 a 72 horas y una recuperación confiable del bloqueo mecánico denso en 48 horas, según se requiera para usos en bloqueos periféricos de nervios que afectan a la función motora de brazos y piernas.

Descripción detallada de la invención

Los beneficios en relación a la seguridad de reducir la dosis de bupivacaína con NeoSTX son importantes para pacientes de todas las edades, pero especialmente para los niños. Los datos epidemiológicos de los registros prospectivos indican que los niños más pequeños tienen un mayor riesgo, en comparación con los adultos, de reacciones sistémicas debidas al anestésico local. Los anestésicos locales y la anestesia regional se utilizan cada vez más para aliviar el dolor después de la cirugía en bebés y niños. El mayor margen de seguridad que ofrecen estas combinaciones tiene un uso único en pediatría. Las dosis, volúmenes y concentraciones óptimos, preferidos y de amplio rango para pacientes pediátricos, para diferentes indicaciones, se derivaron de consideraciones relacionadas con las propiedades fisicoquímicas de NeoSTX y cómo el tamaño de los compartimentos corporales y los volúmenes de distribución se escalan con el peso corporal en niños y bebés mayores.

Definiciones:

Analgesia se refiere a la insensibilidad al dolor sin pérdida de conciencia.

Anestesia se refiere a una pérdida de sensación (local; no causa pérdida de conciencia; sistémica, con pérdida de conciencia) y generalmente de conciencia sin pérdida de funciones vitales.

Vasoconstrictor es un agente que estrecha el lumen de los vasos sanguíneos, especialmente como resultado de la acción vasomotora.

Infiltración se refiere a la inyección en múltiples capas o áreas de tejido.

Inyección se refiere a la inyección en un solo punto de tejido o lumen.

Bloqueo nervioso se refiere a la anestesia local producida por la interrupción del flujo de impulsos a lo largo de un tronco nervioso.

Concentración mínima efectiva ("MEC") es la concentración local más baja de uno o más medicamentos en una ubicación dada suficiente para proporcionar un alivio del dolor.

II Composiciones

A. Bloqueadores del sitio 1 del canal de sodio

Los bloqueadores del sitio 1 son una familia de moléculas conocidas hace tiempo por su bloqueo potente y específico de los canales de sodio controlados por el voltaje. Los bloqueadores de los canales de sodio del sitio 1 incluyen tetrodotoxina (TTX), saxitoxina (STX), descarbamoilsaxitoxina, neosaxitoxina y gonyautoxinas (denominadas conjuntamente aquí "toxinas"). Las tetrodotoxinas se obtienen de los ovarios y huevos de diversas especies de peces globo y ciertas especies de tritones de California. Químicamente, es una amino-perhidroquinolina. Ver *Pharmacological Reviews*, vol. 18 N° 2, pp. 997-1049. La tetrodotoxina sola es demasiado tóxica para ser utilizada como anestésico. Las combinaciones de tetrodotoxina con bupivacaína produjeron un bloqueo del nervio ciático de larga duración en ratas sin gran toxicidad sistémica en comparación con la tetrodotoxina sola (Kohane, et al., *Anesthesiology*, 1998: 119-131). Aunque la toxina del sitio 1 más conocida, la tetrodotoxina, es efectiva como anestésico, es costosa para el uso clínico, ya que debe provenir del pez globo; cuando la bacteria endo-simbiótica que produce la TTX crece *ex vivo*, su producción de TTX disminuye.

La saxitoxina se extrajo por primera vez de la almeja reyna de Alaska, *Saxidomus gigantcus*, donde está presente en algas del género *Gonyaulax*. La fórmula química reportada es $C_{10}H_{15}N_7O_3 \cdot 2HCl$. Se cree que la toxina tiene un núcleo de perhidropurina al que se incorporan dos restos guanidinio. La saxitoxina también es demasiado tóxica para emplearse sola como anestésico local.

La saxitoxina y sus derivados se pueden producir en biorreactores a partir de algas. Los dos derivados, neosaxitoxina (NeoSTX) y descarbamoilsaxitoxina, tienen ventajas en términos del proceso de producción y la potencia. Un estudio examinó el bloqueo del nervio ciático de la rata con varios miembros de la serie de saxitoxinas, incluyendo NeoSTX (Kohane, et al., *Reg. Anesth. Pain Med.*, 2000; 25: 52-9). La saxitoxina y estos dos derivados proporcionan un bloqueo marcadamente sinérgico y un bloqueo prolongado (1-2 días del nervio ciático de la rata *in vivo*) cuando se combinan con bupivacaína o epinefrina.

La neosaxitoxina y la descarbamoilsaxitoxina son potencialmente más potentes y pueden tener ventajas sobre la saxitoxina en la formulación. La neosaxitoxina (NeoSTX) se encuentra en desarrollo clínico como anestésico local de duración prolongada (Rodríguez Navarro, et al., *Anesthesiology*, 2007; 106: 339-45; Rodríguez-Navarro, et al., *Neurotox. Res.*, 2009; 16: 408- 15; Rodríguez-Navarro, et al., *Reg. Anesth. Pain Med.*, 2011; 36: 103-9). Un estudio de Fase 1 de infiltración subcutánea en voluntarios humanos demostró que la NeoSTX provocaba una hipoestesia

cutánea efectiva (Rodríguez-Navarro, et al., *Anesthesiology*, 2007; 106: 339-45) y un segundo estudio de Fase 1 demostró que la combinación con bupivacaína resultó en una analgesia más prolongada en comparación con NeoSTX o bupivacaína sola (Rodríguez-Navarro, et al., *Neurotox. Res.*, 2009; 16: 408-15).

- 5 La presente invención emplea neosaxitoxina. La fuente preferida del bloqueador del sitio 1 del canal de sodio es la neosaxitoxina producida por *Proteus*, Chile.

B. Anestésicos locales

- 10 Tal como se usa aquí, el término "anestésico local" significa un medicamento que proporciona adormecimiento local o alivio del dolor. Los tipos de anestésicos locales incluyen compuestos de aminoacilanilida, tales como lidocaína, prilocaína, bupivacaína, mepivacaína y compuestos anestésicos locales relacionados que tienen varios sustituyentes en el sistema de anillo o en el nitrógeno amino; compuestos aminoalquilbenzoato, tales como procaína, cloroprocaína, propoxicaína, hexilcaína, tetracaína, ciclometacaína, benoxinato, butacaína, proparacaína y
- 15 compuestos anestésicos locales relacionados; cocaína y compuestos anestésicos locales relacionados; compuestos amino carbonato tales como diperodon y compuestos anestésicos locales relacionados; compuestos de N-fenilamidina tales como fenacaína y compuestos anestésicos relacionados; compuestos de N-aminoalquilamida tales como dibucaína y compuestos anestésicos locales relacionados; compuestos de aminocetona tales como falicaína, diclonina y compuestos anestésicos locales relacionados; y compuestos amino éter tales como pramoxina, dimetisiquien y compuestos anestésicos locales relacionados. La presente invención emplea bupivacaína. Se
- 20 prefiere el *levo*enantiómero de bupivacaína cuando la actividad vasoconstrictora del anestésico local es deseable.

Estos medicamentos tienen un promedio de seis a diez horas de alivio del dolor cuando se administran en diferentes sitios y para diferentes tipos de cirugía. Para muchos tipos de cirugía, sería preferible tener duraciones de alivio del

25 dolor de dos o tres días. La bupivacaína es un anestésico local potente y de acción particularmente prolongada. Sus otras ventajas incluyen suficiente anestesia sensorial sin solo bloqueo motor parcial y amplia disponibilidad.

C. Vasoconstrictores.

- 30 Los vasoconstrictores que son útiles son aquellos que actúan localmente para restringir el flujo sanguíneo y, por tanto, retienen los fármacos inyectados en la región donde se administran. Esto tiene el efecto de disminuir sustancialmente la toxicidad sistémica. Los vasoconstrictores preferidos son aquellos que actúan sobre los receptores alfa-adrenérgicos, tales como epinefrina y fenilepinefrina. Otros fármacos y colorantes son vasoconstrictores como efecto secundario, como bupivacaína y levobupivacaína.

35 D. Excipientes y conservantes

Las formulaciones también pueden contener conservantes, agentes de ajuste del pH, antioxidantes y agentes de isotonicidad.

- 40 En la realización preferida, el anestésico se formula en solución salina, o en una solución ácida tamponada, opcionalmente conteniendo un conservante. Se pueden utilizar vehículos de liberación local o sostenida, pero no son preferentes.

45 E. Unidades de dosificación

- En realizaciones preferentes, la NeoSTX, la bupivacaína y opcionalmente la epinefrina se proporcionan en viales en solución acuosa. Según el tipo de formulación, como se describe anteriormente y más abajo, los tamaños de los
- 50 viales pueden variar de 15 a 40 ml y se pueden usar de 1 a 3 viales para un solo paciente en diferentes situaciones. En otra realización, la NeoSTX, el anestésico local y opcionalmente el vasoconstrictor se proporcionan en uno o más viales, opcionalmente liofilizados, luego se rehidratan y se combinan antes de su uso. Para esta segunda realización, los tamaños de vial preferidos podrían oscilar entre 5 y 40 ml.

55 III. Formulaciones y dosificaciones

- Se requieren estudios en animales y seres humanos para determinar las dosis y volúmenes efectivos para el tratamiento de seres humanos. Por ejemplo, el orden de clasificación de la potencia de los bloqueadores de los canales de sodio del sitio 1 de experimentos fisiológicos *in vitro* no predijo el orden de clasificación de la potencia de esos compuestos *in vivo* (Kohane, et al., *Reg. Anesth. Pain Med.*, 2000; 25: 52-9).

- 60 Los siguientes principios imponen límites a las dosis, volúmenes y concentraciones de los anestésicos locales.

Las diferentes situaciones clínicas plantean diferentes demandas en cuanto a la seguridad y eficacia de los anestésicos locales.

- 65 La seguridad sistémica determina el límite superior de la dosis total (mg o mg/kg) de bupivacaína, NeoSTX u otros

anestésicos locales. Existen pequeñas diferencias en la dosis total permisible en función del transcurso temporal de la captación, la vascularización, etc., pero, en general, cada anestésico local tiene una dosis total máxima admisible. Como se describe aquí, la inclusión de epinefrina junto con NeoSTX y bupivacaína aumenta la eficacia y la seguridad sistémica, permitiendo dosis mayores o volúmenes más grandes y proporcionando una mayor duración del alivio del dolor. Sin embargo, hay algunas ubicaciones en el cuerpo donde se debe evitar la epinefrina debido a una vasoconstricción excesiva. Éstas incluyen inyecciones alrededor de los dedos de manos y pies y alrededor del pene. Por tanto, para diferentes usos clínicos, es importante desarrollar formulaciones tanto con como sin epinefrina.

En cualquier región localizada del cuerpo se requiere una concentración local en tejido suficiente de los anestésicos locales para bloquear la transmisión aferente. La concentración local más baja de uno o más medicamentos en una ubicación determinada suficiente para proporcionar un alivio del dolor se denomina "concentración mínima efectiva" o MEC.

Así, las situaciones clínicas que requieren infiltración en grandes volúmenes de tejido requieren mayores volúmenes totales de anestésico local en o por encima de la MEC que las situaciones clínicas que conllevan volúmenes de tejido más pequeños. Si la MEC es similar en diferentes ubicaciones, entonces los volúmenes de tejido más grandes requieren una dosis total mayor que los volúmenes de tejido pequeños.

Para las combinaciones de NeoSTX en solución salina y NeoSTX-bupivacaína en el ensayo clínico en Fase 1 en humanos, fue inesperado que los síntomas sistémicos, que incluyen hormigueo leve y/o entumecimiento de los dedos, labios y lengua, tuvieran lugar a dosis de NeoSTX tan pequeñas como 10 µg en total. Estos síntomas eran leves a dosis de 10 a 15 µg, pero aumentaron en gravedad y fueron acompañados por náuseas transitorias a medida que las dosis aumentaban a 40 µg. Estos síntomas eran inesperados, ya que no se conocían hormigueo ni náuseas a partir de datos no humanos. Estos estudios en humanos también demostraron que la adición de epinefrina a NeoSTX-bupivacaína disminuía dramáticamente la incidencia de estos síntomas en un rango de dosis de NeoSTX de 10 a 30 µg (ver Figura 6). Por tanto, no habría manera de conocer de los datos anteriores la necesidad de epinefrina a esas concentraciones para prevenir el hormigueo y las náuseas. En el ensayo de Fase 1 en humanos, la epinefrina también aumenta dramáticamente la duración del bloqueo por parte de NeoSTX+BPV.

En algunos entornos clínicos, es importante no administrar grandes volúmenes (es decir, más de 20 ml) de anestésico local para evitar la propagación del entumecimiento o la debilidad a otras ubicaciones del cuerpo donde estos efectos no son deseables o incluso peligrosos. Por ejemplo, la inyección de volúmenes superiores de 20 ml para el bloqueo interescaleno del plexo braquial, como se usa para la cirugía de hombro, aumenta el riesgo de desbordamiento a los nervios cercanos del cuello que inervan la laringe, provocando una voz ronca y riesgo de aspiración de líquidos en la tráquea. De manera similar, volúmenes superiores a 20 ml para el bloqueo simpático lumbar aumentan el riesgo de desbordamiento de los nervios somáticos, con un riesgo asociado de debilidad temporal de la pierna debido al adormecimiento de los nervios de los principales músculos de la pierna. En otros entornos, a menos que se utilicen volúmenes muy grandes, algunos tejidos no se cubrirán y el resultado será un alivio inadecuado del dolor. Ejemplos de estos se citan a continuación.

Los ensayos clínicos en humanos han descubierto consideraciones de dosificación específicas que no eran predecibles en base a lo que se sabía previamente con respecto a los bloqueadores del sitio 1 de los canales de sodio. Algunos de estos son contrarios a la sabiduría convencional actual y la práctica clínica en anestesia local, local/regional. Estas consideraciones tienen un impacto adicional en las formulaciones específicas que podrían usarse de manera segura en humanos de una forma no anticipada.

En ratas, el bloqueo nervioso detectable comienza a más de 30 µM en 0,1 ml de inyectado (Kohane, et al., RAPM, 25(1): 1-107 (2000)), que corresponde a una dosis de aproximadamente 1 µg en una rata de 350 g, que sería una dosis de aproximadamente 270 µg en un humano de 70 kg. Como se describe en el Ejemplo 1 y en estudios adicionales, la respuesta a la dosis para la anestesia local se determinó en ratas utilizando NeoSTX en solución salina, NeoSTX-bupivacaína y NeoSTX-bupivacaína-epinefrina (ver Figuras 1, 2, 4 y 5). La concentración de bupivacaína de 0,2% fue la misma para los estudios en ratas y humanos. En ratas, las combinaciones de NeoSTX-bupivacaína dieron una prolongación inconsistente o estadísticamente insignificante del bloqueo en comparación con la bupivacaína sola a dosis de 2 µg/kg de NeoSTX, y se logró una prolongación confiable y robusta solo con dosis de NeoSTX de al menos 3 µg/kg. Estos estudios se realizaron utilizando un volumen de inyección de 0,3 ml. En base a los pesos de las ratas (aproximadamente 250 g), para estas inyecciones, las dosis de NeoSTX de 3 µg/kg corresponden a las concentraciones de NeoSTX en los inyectados de 2,5 µg/ml.

En contraste, en el ensayo de fase 1 en humanos, utilizando combinaciones de NeoSTX-bupivacaína, se encontró que dosis de NeoSTX tan bajas como 5 µg (aproximadamente 0,07 µg/kg para estos humanos adultos) proporcionaron una excelente prolongación del bloqueo, esto es de 4 veces, en comparación con la bupivacaína sola (Figura 7) para un volumen de inyección de 10 ml; esto indica un efecto de prolongación del bloqueo muy fuerte para NeoSTX en combinaciones de NeoSTX-bupivacaína en humanos utilizando una concentración de NeoSTX de 5 µg/10 ml, es decir 0,5 µg/ml.

Por tanto, la NeoSTX en humanos produce una prolongación del bloqueo confiable en combinaciones de NeoSTX-

bupivacaína a una dosis de NeoSTX escalada en peso al menos 40 veces más baja y en una concentración de NeoSTX al menos 5 veces más baja que las dosis efectivas correspondientes de NeoSTX y concentraciones encontradas en ratas. El calendario de dosificación del fármaco y, por consiguiente, los rangos específicos de concentraciones reivindicadas para tipos específicos de cirugías no se podían derivar de la técnica anterior, ya que los animales no pueden ser interrogados en cuanto a los síntomas que no producen una toxicidad bastante significativa. Específicamente, se encontró en estudios en humanos de NeoSTX que los síntomas sistémicos que incluyen hormigueo, entumecimiento de labios, dedos y lengua y eventualmente náuseas se producen a dosis (15 a 40 µg, o aproximadamente 0,2 a 0,6 µg/kg) inferiores a las utilizadas en los estudios en ratas (2 - 5 µg/kg), ver las Figuras 1 a 5, aparecen hormigueo, entumecimiento y náuseas tanto con una toxicidad inmediata por los anestésicos locales existentes como con la intoxicación paralizante por mariscos.

En resumen:

La aparición de estos síntomas a estas dosis bajas no estaba anticipada por estudios previos en ratas o humanos que usaban NeoSTX.

Para NeoSTX, los síntomas se producen muy por debajo de las dosis que producen efectos fisiológicos medibles, como debilidad o deterioro en las medidas respiratorias. Estos síntomas limitan las dosis máximas de NeoSTX-bupivacaína en sujetos despiertos más que en sujetos anestesiados.

Los síntomas de NeoSTX implican menos riesgo que cuando se producen síntomas similares para la dosificación excesiva de bupivacaína. Si la bupivacaína produce un cosquilleo, lo más probable es que pronto aparezcan convulsiones, arritmia o paro cardíaco. Este no es el caso de la NeoSTX.

La epinefrina reduce dramáticamente la severidad de estos síntomas, permitiendo la tolerabilidad de dosis más altas de NeoSTX en estas triples combinaciones en comparación con las combinaciones dobles.

El programa de dosificación del fármaco y, en consecuencia, el rango específico de concentración reivindicada para tipos específicos de cirugías es contrario a lo que se practica en todo el mundo en la dosificación de anestésicos locales. La toxicidad sistémica rara vez es una característica limitante en el uso de anestésicos locales convencionales, por lo que no es necesario ajustar la concentración para tener en cuenta el volumen de inyección. El uso de NeoSTX y compuestos similares requiere un enfoque diferente, donde se requiere un cambio en la composición de la solución del fármaco en sí misma.

Se han desarrollado formulaciones optimizadas para diferentes tipos de situaciones clínicas.

“Analgesia por infiltración de alto volumen” (no según la invención reivindicada)

Una formulación de dosificación de gran volumen de uso, de 35 - 120 ml para humanos adultos y de 0,5 - 1,8 ml/kg para niños, incluye como agentes activos una triple combinación de bupivacaína en un rango de concentración entre 0,1% (1 mg/ml) y 0,25% (2,5 mg/ml), dando una dosis sistémica total de bupivacaína de no más de 225 mg en adultos o 2,5 mg/kg en niños; NeoSTX en un rango de concentración de 0,1 µg/ml - 1 µg/ml, dando una dosis sistémica total de 3,5 - 100 µg en adultos o 0,05 - 1,5 µg/kg en niños, y epinefrina en un rango de concentración de 2 µg/ml (1:500.000 en terminología común) y 10 µg/ml (1:100.000). El uso común de esta formulación sería para la infiltración de tres o cuatro capas de una gran herida quirúrgica para una laparotomía abierta de longitud completa, incisión toracoabdominal o incisión en el flanco.

Algunas de estas operaciones incluyen: parto por cesárea, histerectomía abierta, esófago-gastrectomía, nefrectomía o cirugías de cáncer abdominal grande como colectomías. La infiltración de heridas para el reemplazo total de cadera (artroplastia de cadera) y el reemplazo total de rodilla (artroplastia de rodilla) también serían usos ideales para estas formulaciones. El uso común de esta formulación es para la infiltración de tres o cuatro capas de una herida quirúrgica para una laparotomía abierta de longitud completa, incisión toracoabdominal o incisión en el flanco.

Tabla 1: Formulaciones de gran volumen (adultos) (no según la invención reivindicada)

	Óptima	Preferente	Intervalo más amplio
Volumen	70 ml	50-100 ml	32-120 ml
Concentración NeoSTX	0,3 µg/ml	0,2-0,4 µg/ml	0,1-0,8 µg/ml
Dosis total de NeoSTX	21 µg	10-40 µg	10-100 µg
Concentración bupivacaína	0,2% (2 mg/ml)	0,15-0,25% (1,5-2,5 mg/ml)	0,1-0,3% (1-3 mg/ml)
Concentración epinefrina	5 µg/ml	2,5-7,5 µg/ml	2-10 µg/ml
Usos clínicos típicos	Infiltración en cirugías abdominales grandes, incluyendo cesárea, histerectomía y colectomía Infiltración para reemplazos de cadera y rodilla Bloqueos nerviosos de la pared torácica (bloqueos paravertebrales para cirugía)		

	torácica y cirugía abdominal superior) y pared abdominal (bloqueos del plano transversal del abdomen para cirugía abdominal)
--	--

Tabla 2: Formulaciones de gran volumen (niños) (no según la invención reivindicada) (“/kg” se refiere a la escala del peso corporal del niño)

Volumen	Óptima	Preferente	Intervalo más amplio
Concentración NeoSTX	0,3 µg/ml	0,2-0,4 µg/ml	0,1-0,8 µg/ml
Dosis total de NeoSTX	0,3 µg/kg	0,2-0,4 µg/kg	0,1-1,5 µg/kg
Concentración bupivacaína	0,2% (2 mg/ml)	0,15-0,25% (1,5-2,5 mg/ml)	0,1-0,3% (1-3 mg/ml)
Concentración epinefrina	5 µg/ml	2,5-7,5 µg/ml	2-10 µg/ml
Usos clínicos típicos	Infiltración en cirugías abdominales grandes, incluyendo cirugías de cáncer y anomalías congénitas Infiltración para reemplazos de cadera congénitos Bloqueos nerviosos de la pared torácica (bloqueos paravertebrales para cirugía torácica y cirugía abdominal superior) y pared abdominal (bloqueos del plano transversal del abdomen para cirugía abdominal)		

5

“Volumen medio, duración intermedia”

Estos usos implican un volumen total de 20 - 40 ml en adultos o 0,3 - 0,5 ml/kg en niños. En estas aplicaciones, los volúmenes deben mantenerse comparativamente bajos para evitar la propagación a objetivos no deseados. Por ejemplo, para la cirugía de hombro, se usa comúnmente el bloqueo interescaleno del plexo braquial. Se emplea una guía de ultrasonido para la colocación precisa de la aguja y el volumen total está limitado para evitar la propagación a objetivos no deseados, como el nervio laríngeo recurrente (que afecta el funcionamiento de la laringe). Los bloqueos actualmente disponibles suelen durar 10 horas y rara vez hasta 15-18 horas. A menudo, esto significa que los bloqueos duran hasta la noche y los pacientes tienen dolor intenso la primera noche del postoperatorio.

15

En este régimen, es deseable tener bloqueos que produzcan el alivio del dolor de manera confiable durante al menos 24 horas (es decir, para pasar la primera noche) y de hasta 48 - 72 horas, pero el bloqueo motor denso y los componentes ligeros del bloqueo deben disminuir en alrededor de 24 horas, de modo que el paciente tenga mayor movilidad del brazo y la mano (para el bloqueo del plexo braquial) o de la pierna (para los bloqueos femoral, plexo lumbar o ciático) el día después de la cirugía.

20

Muchos de los usos previstos para las formulaciones de volumen moderado implican tanto bloqueos nerviosos periféricos o bloqueos del plexo (inyección perineural) como infiltración (inyección a lo largo de las capas de una herida quirúrgica). Los usos de esta formulación incluyen cirugía de hombro, mano o brazo, infiltración o bloqueo ilio-inguinal/ilio-hipogástrico para la reparación de la hernia inguinal, bloqueo del pene para la reparación de hipospadias, bloqueo femoral para el reemplazo total de rodilla o reparación del ligamento cruzado anterior, bloqueo del nervio intercostal para la cirugía torácica o bloqueo de nervios femorales y ciáticos para la amputación de piernas o cirugía de pie y tobillo. Para la cirugía de cadera, esto podría implicar un bloqueo del plexo lumbar y un bloqueo ciático de menor volumen. Esta formulación también podría usarse para el bloqueo nervioso (femoral y ciático, plexo lumbar y ciático) de la articulación de la cadera o la rodilla para la cirugía de reemplazo articular.

25

30

Para algunos de estos usos de volumen medio, en particular en bloqueo de nervios periféricos y del plexo, tiene gran prioridad proporcionar tres características: anestesia (insensibilidad casi completa) para la cirugía durante períodos de 3 a 12 horas, analgesia (alivio del dolor prolongado) después de la cirugía durante períodos de al menos 24 horas, mientras se asegura la recuperación del bloqueo motor para permitir cierta fuerza en el movimiento de la extremidad en un tiempo de 24 a 48 horas.

35

Para el bloqueo de nervios periféricos y de plexo con efectos motores en brazos y piernas, según el requisito para la recuperación del bloqueo motor de 24 a 48 horas, es probable que las formulaciones con NeoSTX-bupivacaína sin epinefrina sean ideales, como se detalla en las siguientes tablas.

40

Tabla 3: Formulaciones de volumen medio (adultos)

Volumen	Óptima	Preferente	Intervalo más amplio
Concentración NeoSTX	0,4 µg/ml	0,3-0,5 µg/ml	0,2-2 µg/ml
Dosis total de NeoSTX	10 µg	8-20 µg	8-150 µg
Concentración bupivacaína	0,2% (2 mg/ml)	0,15-0,25% (1,5-2,5 mg/ml)	0,1-0,3% (1-3 mg/ml)
Concentración epinefrina	0 µg/ml	0 µg/ml	1-5 µg/ml

Usos clínicos típicos	Bloqueo interescalénico para cirugía de hombro, brazo o mano Bloqueo de plexo lumbar para reemplazo de cadera Bloqueo femoral o safeno para reemplazo de rodilla o reconstrucción de ligamentos de rodilla Bloqueo ciático para cirugía de pie y tobillo Bloqueos femorales y ciáticos para amputación de pierna, cirugía de pie o tobillo Bloqueos nerviosos (femoral y ciático, plexo lumbar y ciático) para articulación de cadera o rodilla para cirugía de reemplazo articular
-----------------------	--

* No según la invención reivindicada

Tabla 4: Formulaciones de volumen medio (niños) (“/kg” se refiere a la escala del peso corporal del niño)

	Óptima	Preferente	Intervalo más amplio
Volumen	0,4 ml/kg	0,3-0,5 ml/kg	0,2-0,6 ml/kg
Concentración NeoSTX	0,4 µg/ml	0,3-0,5 µg/ml	0,2-2 µg/ml
Dosis total de NeoSTX	0,2 µg/kg	0,1-0,3 µg/kg	0,1-1,5 µg/kg
Concentración bupivacaína	0,2% (2 mg/ml)	0,15-0,25% (1,5-2,5 mg/ml)	0,1-0,3% (1-3 mg/ml)
Concentración epinefrina	0 µg/ml	0 µg/ml	1-5 µg/ml
Usos clínicos típicos	Bloqueo interescalénico para cirugía de hombro Bloqueo de plexo lumbar para reparación de cadera congénita Bloqueo femoral o safeno para reconstrucción de ligamentos de rodilla Bloqueo ciático para cirugía de pie y tobillo		

5 * No según la invención reivindicada

“Volumen bajo, larga duración”

10 Esta formulación es para puntos donde se diseña un efecto muy prolongado y los volúmenes se pueden mantener pequeños para evitar la propagación a otros sitios. Un ejemplo es el bloqueo simpático lumbar para el síndrome de dolor regional complejo/distrofia simpática refleja o insuficiencia vascular de la pierna o para el bloqueo del plexo celiaco en pancreatitis o cáncer de páncreas.

15 Para el bloqueo simpático lumbar, la inyección se lleva a cabo para bloquear un grupo de nervios que producen vasoconstricción en la pierna. Cuando estos nervios se bloquean, el resultado es un aumento del flujo sanguíneo a la pierna y una reducción del dolor de ciertas enfermedades. Para este bloqueo nervioso, el volumen debe ser relativamente bajo (de 8 a 20 ml) para evitar la propagación a los nervios somáticos del plexo lumbar, lo que debilitaría la pierna. Sin embargo, a diferencia del volumen medio, la duración intermedia, es deseable que este tipo de bloqueo dure el mayor tiempo posible, ya que cuando se realiza con guía fluoroscópica en volúmenes pequeños hay muy poco bloqueo sensorial o motor. Por tanto, deben utilizarse concentraciones relativamente altas de los tres componentes para esta aplicación con el fin de lograr una duración del bloqueo simpático y un aumento del flujo sanguíneo local durante al menos cuatro días.

25 Otras aplicaciones que pueden implicar este uso de bajo volumen y larga duración incluirían el bloqueo del nervio ciático de duración prolongada, donde la recuperación motora rápida no constituye un problema, como en el caso de la amputación de una pierna.

Tabla 5: Formulaciones de volumen bajo (adultos)

	Óptima*	Preferente	Intervalo más amplio
Volumen	15 ml	8-20 ml	5-25 ml
Concentración NeoSTX	1 µg/ml	0,6-1,5 µg/ml	0,4-5 µg/ml
Dosis total de NeoSTX	15 µg	10-30 µg	5-80 µg
Concentración bupivacaína	0,2% (2 mg/ml)	0,2-0,4% (2-4 mg/ml)	0,1-0,5% (1-5 mg/ml)
Concentración epinefrina	5 µg/ml	2,56-7,5 µg/ml	1-5 µg/ml
Usos clínicos típicos	Bloqueo del nervio lumbar simpático en distrofia simpática refleja o enfermedad vascular periférica Bloqueo plexo celiaco en pancreatitis crónica o cáncer de páncreas Bloqueo nervio ciático de duración prolongada cuando no es crítica la recuperación motora rápida, como en el caso de la amputación de una pierna		

30 * No según la invención reivindicada

Tabla 6: Formulaciones de bajo volumen (niños) (no según la invención reivindicada)

	Óptima	Preferente	Intervalo más amplio
Volumen	0,25 ml/kg	0,15-0,4 ml/kg	0,1-0,5 ml/kg
Concentración NeoSTX	1 µg/ml	0,6-1,5 µg/ml	0,4-5 µg/ml

Dosis total de NeoSTX	0,25 µg/kg	0,1-0,5 µg/kg	0,05-1,2 µg/kg
Concentración bupivacaína	0,2% (2 mg/ml)	0,2-0,4% (2-4 mg/ml)	0,1-0,5% (1-5 mg/ml)
Concentración epinefrina	5 µg/ml	2,5-7,5 µg/ml	1-5 µg/ml
Usos clínicos típicos	Infiltración en cirugías abdominales grandes, incluyendo cirugías de cáncer y anomalías congénitas, Infiltración para reemplazos de cadera congénitos, bloqueos nerviosos de la pared torácica (bloqueos paravertebrales para cirugía torácica y cirugía abdominal superior) y pared abdominal (bloqueos del plano transversal del abdomen para cirugía abdominal)		

Combinaciones de dos medicamentos NeoSTX + BPV

5 Es deseable un agente de liberación no sostenida que proporcione de forma confiable 6-12 horas de bloqueo nervioso de grado quirúrgico, seguido de hasta aproximadamente 48 h de bloqueo menor sin tratamiento adicional. El primer período sería útil durante la operación, así como en el período inmediato posterior a la operación; el último proporcionaría una analgesia decreciente y permitiría un mayor uso de la parte del cuerpo afectada a medida que la curación progresa. NeoSTX + BPV puede proporcionar esta duración de bloqueo.

10 La presente invención se entenderá mejor en referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1: Neosaxitoxina (NeoSTX) con bupivacaína proporciona analgesia local de larga duración en ensayos clínicos sin aumento de la toxicidad

15 Un estudio reciente de NeoSTX en ovejas utilizando la inyección subcutánea demostró que la bupivacaína no empeoraba las medidas sustitutas de la toxicidad respiratoria o neuromuscular de NeoSTX. En un modelo independiente, la infusión intravenosa deliberada de NeoSTX demostró una toxicidad cardiovascular notablemente leve, mucho menos que en estudios previos comparables de bupivacaína. El estudio actual investiga más a fondo la respuesta a la dosis de las combinaciones NeoSTX y NeoSTX-bupivacaína en medidas neuroconductuales del
20 bloqueo del nervio ciático de la rata, así como en la toxicidad local y sistémica de estas combinaciones. Estos experimentos se realizaron como estudios preclínicos para una solicitud de un nuevo fármaco en investigación, utilizando formulaciones NeoSTX fabricadas para uso clínico en un ensayo clínico de fase 1 planificado.

25 Las hipótesis fueron las siguientes: 1) a dosis fijas de NeoSTX, la adición de bupivacaína aumenta la intensidad y la duración del bloqueo del nervio ciático de la rata; 2) en presencia o ausencia de bupivacaína, la intensidad y la duración del bloqueo aumentan con la dosis de NeoSTX; 3) los efectos histológicos de NeoSTX (en solución salina o en combinación con bupivacaína) sobre el nervio ciático de la rata son benignos al intervalo de dosis deseado y no son estadísticamente diferentes de los del vehículo o los nervios no tratados; 4) en un modelo de infusión intravenosa accidental rápida, NeoSTX y bupivacaína por separado generaron los puntos finales respiratorios y electrocardiográficos en tiempos diferentes. Las combinaciones que utilizan concentraciones totales tanto de
30 NeoSTX como de bupivacaína desarrollaron toxicidad sistémica más rápidamente (es decir, con un tiempo de infusión más corto y una menor dosis acumulativa), mientras que las combinaciones de concentración media de cada componente desarrollaron toxicidad más lentamente, es decir, con una mayor dosis acumulativa.

35 *Materiales y métodos*

Métodos: Se administró NeoSTX, bupivacaína al 0,25% o una combinación mediante inyección al nervio ciático de ratas Sprague-Dawley. La función sensorial-nocifensiva se evaluó mediante pruebas en placa caliente (hotplate) y con filamento de Von Frey. La función motora propioceptiva se evaluó mediante empuje postural extensor. Siete días después, se diseccionaron los nervios ciáticos y se examinaron histológicamente para determinar la toxicidad. Se calculó también la LD50 para la combinación NeoSTX y NeoSTX-bupivacaína después de la inyección ciática. Para emular una sobredosis intravenosa accidental, ratas anestesiadas con isoflurano que respiraban espontáneamente recibieron infusiones de NeoSTX solo, bupivacaína sola o combinaciones de NeoSTX-bupivacaína hasta alcanzar los puntos finales respiratorios y electrocardiográficos.
45

Fármacos

En el modelo de inyección de nervio ciático, los fármacos se prepararon el día del experimento y el volumen de inyección se fijó en 0,3 ml. La NeoSTX (Proteus SA, Chile) fue transportada y almacenada de acuerdo con las
50 normas de seguridad del Hospital Infantil de Boston, de conformidad con el Comité de Harvard sobre Seguridad Microbiológica. La NeoSTX stock contiene 20 µg/ml de neosaxitoxina a pH 4,5.

La NeoSTX se diluyó en solución salina al 0,9% o en clorhidrato de bupivacaína (SENSORCAINE®, APP Pharmaceuticals, Schaumburg, IL). Dependiendo de la concentración final prevista de NeoSTX, se utilizaron viales comerciales de bupivacaína y bupivacaína 5 mg/ml (0,5%) o bupivacaína 2,5 mg/ml (0,25%) para alcanzar
55 concentraciones finales de bupivacaína de 2 mg/ml (0,2%) en los inyectados finales. En el modelo de sobredosis iv, las concentraciones de infusión fueron las siguientes: bupivacaína 2 mg/ml, NeoSTX 1,88 µg/ml, combinación de concentración total bupivacaína 2 mg/ml y NeoSTX 1,88 µg/ml, combinación de concentración media: bupivacaína 1

mg/ml y NeoSTX 0,94 µg/ml. Las velocidades de infusión se ajustaron de acuerdo con el peso del animal para garantizar el suministro de una dosis de fármacos a escala de peso constante. Así, como fármacos individuales, se administró bupivacaína a 3,2 mg/kg/min y NeoSTX a 3 µg/kg/min. Los animales de la combinación de dosis total recibieron ambas bupivacaína 3,2 mg/kg/min y NeoSTX a 3 µg/kg/min, mientras que los animales de la combinación de dosis media recibieron bupivacaína a 1,6 mg/kg/min y NeoSTX 1,5 µg/kg/min, y todos los animales recibieron una tasa constante de administración de líquidos según su peso de 1,6 ml/kg/min.

Cuidado animal

Se obtuvieron ratas macho Sprague-Dawley de Charles River Laboratories (Wilmington, MA): se emplearon adultos jóvenes que pesaban de 200 a 250 g para el modelo de inyección ciática y 325-400 g de animales para el modelo de sobredosis iv. Los animales fueron cuidados y sacrificados de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en el Children's Hospital. Se desarrollaron procedimientos de manejo para habituar a los animales al paradigma de prueba y minimizar la analgesia inducida por estrés.

Inyección ciática

Las ratas se anestesiaron brevemente con isoflurano en forma de cono nasal. Se introdujo una aguja posteromedial en el trocánter mayor, apuntando en dirección anteromedial. Una vez en contacto con el hueso, se inyectaron 0,3 ml de solución. Se utilizó siempre la pata izquierda para el bloqueo; la derecha sirvió como control y medida de la toxicidad sistémica (Kohane, et al., Anesthesiology, 1998: 119-131).

Pruebas neuroconductuales

Se empleó una batería de evaluación neuroconductual modificada de Thalhammer et al., que emplea medidas de deficiencias sensoriales, nocifensivas y propioceptivas motoras para evaluar la duración y la intensidad del bloqueo después de la inyección perineural ciática (Thalhammer, et al., Anesthesiology, 1995; 82: 1013-1025). Los investigadores desconocían la dosis y la asignación del tratamiento. La sensación se evaluó primero utilizando la prueba de filamento Von Frey (VF) (Touch-Test Sensorory Evaluator, North Coast Medical Inc., CA). Después de una breve adaptación a una jaula de malla de alambre, se aplicaron filamentos de Von Frey de fuerza ascendente hasta la observación de la retirada de la pata. Se tuvo cuidado de aplicar los filamentos solo en las superficies plantares laterales que recibieron una inervación confiable del nervio ciático. Los filamentos se aplicaron en una serie creciente hasta que se observó la retirada o hasta que se alcanzó el máximo de 300 g (Yahalom, et al., Anesthesiology, 2011; 114 (6): 1325-1335). La fuerza del empuje postural del extensor (EPT) en gramos ejercida en equilibrio y el tiempo de extracción de la placa caliente a 56 grados Celsius se midieron como se describe en Kohane, et al. (Kohane 2000).

Se tomaron medidas neuroconductuales en la línea base de preinyección, 15 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12 h el primer día y luego cada 4 h el segundo día hasta la recuperación motora. En cada punto de tiempo, se tomaron y promediaron tres medidas de la fuerza EPT y la latencia en la placa caliente. Estudios previos de los bloqueadores de sodio del sitio 1 que utilizan este paradigma han demostrado que dosis más altas causan alteraciones contralaterales transitorias de las medidas neuroconductuales, que reflejan analgesia sistémica y/o debilidad sistémica (Kohane, et al., Reg. Anesth. Pain Med., 2001; 26 (3) 239-245).

En estudios anteriores, inyecciones con 0,3 ml de bupivacaína 2,5 mg/ml resultaban en un bloqueo completo (basado en los puntos de corte definidos más adelante en este párrafo) para > 98% de los animales. En los análisis, se asumió que el bloqueo incompleto con las formulaciones de ensayo reflejaba los verdaderos efectos farmacológicos de esas dosis, en lugar de un error de inyección técnico. El trabajo anterior empleaba cortes calificando a los animales como bloqueo sensorial o bloqueo motor: 7 s para la latencia térmica, 40 g para el empuje postural extensor. La recuperación del 50% se definió como 7 s y, si no se alcanzaba el corte, la duración del bloqueo se consideraba cero. Se encontró que el uso de estos puntos de corte puede descontar grados de deterioro sensorial y motor de potencial importancia clínica. Para mejorar estos cortes, se calculó el mayor cambio a partir de la línea base hasta 15 minutos después de la inyección del vehículo y estos valores se utilizaron como umbral para un bloqueo de placa caliente y EPT (0,8 s y 8 g, respectivamente). Se consideró que el umbral del bloqueo era 60 g para los ensayos de Von Frey. La recuperación se definió como el retorno a los mismos valores.

Procedimientos histológicos

Siete días después de la inyección ciática, a las ratas se les administró una sobredosis de pentobarbital (150 mg/kg) y se fijaron mediante perfusión transcardíaca en dos etapas: se infundieron 100 ml de solución salina al 0,9%, seguido de 200 ml de un fijador de Karnovsky modificado que contenía un 2,5% de glutaraldehído y un 1,25% de paraformaldehído en tampón fosfato 0,1 M. Los nervios ciáticos izquierdo y derecho se diseccionaron y se almacenaron en un fijador diluido a 4°C. El tejido ciático se embebió en plástico utilizando un protocolo estándar de microscopía electrónica de tetróxido de osmio, se cortó en secciones semi-délgadas y se tiñó con azul de toluidina. Las secciones fueron analizadas por un neurocientífico experimentado (G.C.) utilizando el sistema de puntuación de Estebe & Myers; este neurocientífico desconocía las asignaciones grupales en el ensayo (Estebe, Anesthesiology,

2004; 100: 1519-25).

Toxicidad sistémica con inyección perineural ciática.

5 Se evaluó la toxicidad sistémica subletal midiendo las alteraciones propioceptivas sensoriceptivas y sensoriales de las extremidades posteriores derechas después de inyecciones ciáticas de las extremidades posteriores izquierdas como se describe en los párrafos "Pruebas neuroconductuales" anteriores. A dosis más altas de NeoSTX, solo o en combinación con bupivacaína, un número creciente de animales desarrollaron apnea o respiración entrecortada. Para minimizar la angustia en este paradigma que involucra animales despiertos, cualquier animal con apnea o jadeo se sacrificó inmediatamente con pentobarbital intraperitoneal (100 mg/kg), y esto se tomó como un evento letal. El cálculo de LD50 se describe en la sección Procedimientos estadísticos siguiente.

Toxicidad sistémica con infusión intravenosa

15 Para simular una inyección intravenosa accidental, ratas que respiraban espontáneamente, anestesiadas con isoflurano, recibieron infusiones a través de una cánula de la vena de la cola de la solución que contenía el fármaco hasta el punto final de asistolia. Se asignaron al azar 26 ratas a 4 grupos: NeoSTX simple (n = 6); bupivacaína (n = 7); combinación NeoSTX-bupivacaína de concentración total (n = 7); y combinación NeoSTX-bupivacaína de concentración media (n = 6), utilizando las concentraciones de fármaco y las tasas de infusión detalladas en la sección titulada "Fármacos". La anestesia se indujo por inhalación de isoflurano al 3 - 5% en oxígeno y se mantuvo con isoflurano al 1% mediante un cono nasal. Se colocó un catéter en la vena de la cola, se enjuagó con 2 ml de solución salina al 0,9% y se conectó a una bomba de jeringa Medfusion (Smiths Medical, St Paul, MN). Se monitorearon los signos vitales y se adquirieron datos fisiológicos de forma continua con el equipo Powerlab y el software LabChart (AD Instruments, Sydney, Australia). Se tomaron las medidas de la línea base (análisis fuera de línea) una vez que todo el equipo de monitoreo estaba calibrado y conectado (ECG, temperatura, oxímetro de pulso, transductor de presión del circuito de Bain y pletismógrafo de la vena de la cola), se accedió a la vena de la cola y la rata se mantuvo en un plano estable de anestesia al 1% inspirando isoflurano en oxígeno durante al menos 5 minutos. Las infusiones descritas en el párrafo titulado "Fármacos" se iniciaron inmediatamente después de un corto período de registro de referencia y se continuaron hasta que se alcanzó la asistolia. Los puntos finales primarios para el análisis fueron los siguientes: (1) apnea (cambios de presión indetectables en el circuito de Bain) y (2) asistolia. Los puntos finales secundarios fueron: bradicardia (frecuencia cardíaca <270), cambios perjudiciales en la forma de onda electrocardiográfica (incluido bloqueo cardíaco, complejo QRS ancho, latidos auriculares o ventrículos ectópicos o intervalo QTc prolongado) y pérdida de pulsatilidad de la arteria caudal por pletismografía.

35 *Procedimientos estadísticos*

Todas las mediciones se resumen como medianas con rangos intercuartiles o media \pm desviación estándar de la media. Los cambios en las pruebas de función neuroconductual se evaluaron en un modelo no paramétrico de Friedman con tratamiento y dosis de NeoSTX como factores fijos, con valores de P ajustados de Bonferroni, en comparaciones múltiples (Montgomery, D., Design and Analysis of Experiments, 5ª edición, 2001, Nueva York, NY: John Wiley & Sons, Inc.). Además se estudiaron combinaciones de dosis clínicamente relevantes de 1 o 2 μ g/kg con los Test-U de Mann-Whitney. La histología nerviosa se analizó con un modelo de Kruskal-Wallis. Se aplicó el análisis Probit con la máxima verosimilitud para calcular la dosis letal mediana (LD50) para cada tratamiento farmacológico con una verosimilitud en intervalos de confianza del 95% obtenidos por el método de registro logarítmico de perfil en el modelo de sobredosis iv, los datos de tiempo hasta el evento se resumieron utilizando las curvas de Kaplan-Meier. Se realizaron comparaciones por pares múltiples de las curvas de supervivencia a bupivacaína sola y los valores P inferiores a 0,017 se consideraron estadísticamente significativos (Finney, Arch. Toxicol., 1985; 56: 215-218; Faraggi, et al., Statist. Med., 2003; 22: 1977- 1988). El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS (versión 19.0, SPSS Inc./IBM, Chicago, IL).

50 *Resultados*

En un intervalo de dosis, la adición de bupivacaína a NeoSTX causó un bloqueo más intenso y más prolongado de la función nocifensiva y propiceptiva motora en comparación con NeoSTX solo. Véase la Tabla 7. La puntuación de lesiones histológicas en general fue muy baja para todos los grupos, con valores medios e IQR de 0 en la escala de Estebe-Myers. Con la inyección subcutánea, la adición de bupivacaína a NeoSTX no produjo un aumento en la toxicidad sistémica (LD50) en comparación con NeoSTX solo. Con la infusión intravenosa, NeoSTX, bupivacaína y sus combinaciones mostraron diferentes transcurso de tiempo para alcanzar los puntos finales respiratorios frente a los electrocardiográficos. Véase la tabla 8.

60 *Medidas neuroconductuales*

Intensidad de bloqueo

65 Las figuras 1A-1F muestran la dependencia de la intensidad del bloqueo a los 15 minutos de la dosis de NeoSTX administrada en presencia o ausencia de bupivacaína. Todas las formulaciones que contienen bupivacaína se

asociaron con un bloqueo completo de las tres medidas de comportamiento en ese momento. En ausencia de bupivacaína, dosis de NeoSTX solo inferiores o iguales a 3 µg/kg produjeron un bloqueo incompleto para la mayoría de los animales.

5 *Duración del Bloqueo*

En comparación con los animales que recibieron inyecciones de NeoSTX en solución salina, la adición de bupivacaína produjo aumentos sustanciales en el tiempo hasta el 100% de recuperación del bloqueo térmico y mecánico sensorialnocifensivo y propioceptivo motor ($P < 0,001$). Los resultados se muestran en las Figuras 2A-2F. El análisis de pares corregido por Bonferroni de los grupos que recibieron dosis crecientes de NeoSTX con y sin bupivacaína demostró que el grupo de bupivacaína tenía duraciones de bloqueo significativamente más largas a todas las dosis superiores a 1 µg/kg (Figura 2A).

El tiempo medio de recuperación al 100% después de la inyección de bupivacaína al 0,25% solo fue de 2,2 h (1,9 a 2,9) para la prueba de placa caliente, 2,2 h (1,8 a 2,6) para la prueba EPT y 1,9 h (1,7 a 2,7) para la prueba VF. La inyección de bupivacaína al 0,25% combinada con 1 µg/kg de NeoSTX aumentó significativamente el tiempo de la recuperación al 100% en Von Frey (2,8 h, 2,2 – 3,5, $P = 0,05$) y las pruebas EPT (3,1 h, 2,8 – 3,9, $P < 0,001$), pero no aumentó el tiempo de recuperación al 100% del comportamiento nocifensivo en la placa caliente (2,5 h, 2,0 – 3,5, $P = 0,4$). Se calculó el tiempo hasta el 50% de recuperación, en horas, para todas las pruebas y dosis, se muestra en la Tabla 7. El tiempo hasta el 50% de Von Frey se incrementó significativamente en los animales después de 1 µg/kg de NeoSTX y bupivacaína en comparación con la bupivacaína sola (2,5 h, 1,7 – 2,9 en comparación con 1,5 h, 1,5 – 2,1, $P = 0,03$), mientras que EPT y placa caliente fueron significativamente diferentes. Sin embargo, la combinación de 2 µg/kg de NeoSTX con bupivacaína causó un aumento significativo y sustancialmente mayor del de recuperación al 100% de la respuesta en la placa caliente (10,8 h, 9,1 – 17,8, $P < 0,001$), en la respuesta EPT (22 h, 15 - 28, $P < 0,001$) y la respuesta Von Frey (4,7 h, 3 - 11, $P < 0,001$).

Tabla 7: Tiempo 50% de recuperación de miembro inferior en ensayos en placa caliente, EPT y von Frey

Grupo de tratamiento	Ensayo neuroconductual		
	Placa caliente	Empuje extensor postural	Von Frey
Bupivacaína (n=20)	1,5 (1,49 - 2,13)	2,01 (1,51 - 2,39)	1,55 (1,51 - 2,09)
1 µg NeoSTX (n=4)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 1,50)	0,00 (0,00 - 1,31)
1 µg NeoSTX + Bup (n=8)	1,61 (1,52 - 2,72)	1,73 (0,78 - 1,92)	2,52 (1,66-2,92)
2 µg NeoSTX solo (n=8)	0,00 (0,00 - 1,03)	0,00 (0,00 - 1,57)	0,00 (0,00 - 1,14)
2 µg NeoSTX + Bup (n=11)	3,77 (2,61 - 10,13)	9,09 (3,84 - 17,77)	3,63 (2,53 - 8,50)
3 µg NeoSTX solo (n=20)	0,16 (0,00 - 1,48)	0,00 (0,00 - 0,56)	0,00 (0,00 - 1,31)
3 µg NeoSTX + Bup (n=27)	3,53 (2,78 - 4,63)	17,91 (12,06 - 22,51)	4,52 (3,51 - 9,00)
3,5 µg NeoSTX solo (n=12)	0,92 (0,00 - 2,01)	0,00 (0,00 - 7,42)	0,00 (0,00 - 1,87)
3,5 µg NeoSTX + Bup (n=13)	20,58 (18,12 - 24,04)	10,32 (3,66 - 11,56)	6,11 (3,28 - 11,94)
Valores mediana (IQR)			

30 *Toxicidad sistémica*

Como marcador para la distribución sistémica de fármacos después de la inyección ciática, se obtuvieron medidas neuroconductuales de la extremidad derecha no inyectada. En comparación con la bupivacaína sola, la inyección de NeoSTX con bupivacaína se asoció con un aumento de la intensidad de bloqueo EPT a los 15 minutos ($P = 0,001$), pero no se asoció significativamente con cambios en la respuesta en placa caliente o Von Frey (Figuras 2C, 2E). En el modelo corregido de Bonferroni que utiliza la dosis de NeoSTX y la presencia de bupivacaína como variables, la combinación de NeoSTX con bupivacaína en placa caliente (2A, 2D) y EPT (2B, 2E) bloqueaba significativamente más que la bupivacaína sola en la extremidad contralateral a dosis de 3 µg/kg ($P = 0,011$ y $P = 0,038$, respectivamente) y 3,5 µg/kg ($P < 0,001$ y $P = 0,036$, respectivamente). Para los bloques contralaterales relativamente pequeños observados, ANOVA no reveló diferencias significativas en el tiempo de recuperación al 100% en la extremidad contralateral entre los animales de la combinación NeoSTX y NeoSTX-bupivacaína cuando la dosis de NeoSTX era inferior a 3 µg/kg (Figura 2E).

45 *Ensayo LD50*

Dada la ausencia de mortalidad en el grupo NeoSTX de 3 µg/kg, la dosis se escaló hasta un máximo de 8 µg/kg. Esta dosis máxima produjo una mortalidad del 100% a los 30 minutos de la administración, tanto para NeoSTX solo como en combinación con bupivacaína. En todos los animales, la muerte se debió a apnea terminal. Se calculó la LD50 en 4,9 µg/kg (IC 95% = 4,2 – 6,2) para NeoSTX solo y 5,7 µg/kg (IC 95% = 4,9 – 7,9) para NeoSTX con bupivacaína (Figura 4). La escalada de NeoSTX en todo el rango medido estaba significativamente asociada al aumento de la letalidad ($Z = 5,82$, $P < 0,001$) y el efecto de la disminución de la mortalidad al agregar bupivacaína tenía significación estadística ($Z = 1,86$, $P = 0,06$). El punto de énfasis aquí es que la administración conjunta de bupivacaína disminuía, en lugar de aumentar, la toxicidad sistémica de NeoSTX.

Tabla 8: Signos vitales en la línea base para el modelo de sobredosis intravenosa entre 4 Grupos de Tratamiento

Características	Grupos de tratamiento				P
	Bupivacaína (n=7)	NeoSTX (n=6)	Comb. dosis alta (n=7)	Comb. dosis baja (n=6)	
Peso (kg)	0,34 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,19
Temperatura (°C)	37,7 ± 0,3	37,6 ± 0,4	37,4 ± 0,4	37,4 ± 0,5	0,59
Ritmo cardiaco (BPM)	354 ± 33	377 ± 35	359 ± 32	357 ± 26	0,58
R. respiratorio (BPM)	71 ± 12	82 ± 11	77 ± 12	78 ± 11	0,41
Intervalo QT (ms)	0,10 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,19
Intervalo PR (ms)	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,09
Intervalo QRS (ms)	0,015 ± 0,003	0,013 ± 0,003	0,014 ± 0,003	0,015 ± 0,003	0,61

NeoSTX = Neosaxitoxina. Media ± SD, valores P basados en ANOVA

5 Histología nerviosa

La puntuación de Estebe-Myers de la lesión del nervio reveló un perfil histológico muy benigno después de la inyección ciática. Para todas las condiciones de tratamiento, la puntuación media de la lesión del nervio de Estebe-Myers fue 0 (IQR 0 - 0). Ningún nervio fue calificado con una puntuación de 3 o 4. No hubo diferencias estadísticas entre ningún grupo de tratamiento y los nervios ciáticos de control no inyectados (derecha). El número total de nervios examinados incluían: vehículo 19, bupivacaína 0,25% sola 19, contralateral (lado derecho no inyectado) 16, NeoSTX 1 µg/kg en solución salina 4, NeoSTX 1 µg/kg en bupivacaína 8, NeoSTX 2 µg/kg en solución salina 4, NeoSTX 2 µg/kg en bupivacaína 7, NeoSTX µg/kg en solución salina 19, NeoSTX 3 µg/kg en bupivacaína 27, NeoSTX 3,5 µg/kg en solución salina 12, NeoSTX 3,5 µg/kg en bupivacaína 13, NeoSTX 4 µg/kg en solución salina 1, NeoSTX 4 µg/kg en bupivacaína 6. Para verificar la validación de las lecturas del histólogo ciego, se obtuvieron diapositivas de secciones de nervios de control positivo tomados de animales a los que se había practicado una lesión nerviosa deliberada (modelo de ligadura suelta), y procesado con el mismo protocolo. Todos estos nervios de control positivo recibieron altas calificaciones de lesión, con puntuaciones de Estebe-Myers de 3 o 4.

Esto demuestra que la combinación de NeoSTX con bupivacaína aumenta la duración y la confiabilidad del bloqueo ciático sin aumentar la neurotoxicidad o la toxicidad sistémica (reduciendo la LD50) después de inyección subcutánea.

El estudio demuestra que, en ratas, la coinyección ciática de bupivacaína al 0,25% con NeoSTX incrementó la intensidad y la duración del bloqueo nocifensivo al estímulo térmico sin aumentar la neurotoxicidad o la letalidad. Cuando se agrega bupivacaína a 3 µg/kg de NeoSTX, una dosis de escala de peso aproximadamente 2 veces mayor que la empleada previamente en humanos, el porcentaje de animales bloqueados efectivamente aumentó del 50 al 100%. A dosis clínicamente relevantes (1 y 2 µg/kg), la combinación de NeoSTX con bupivacaína condujo a un aumento significativo en la intensidad y la duración del bloqueo sensorial-nocifensivo.

En las Figuras 4A-C se muestra la intensidad y la duración del bloqueo sensorial en grupos de ratas que recibieron bupivacaína al 0,2% (Figura 4A), bupivacaína al 0,2% con NeoSTX 3 µg/kg (Figura 4B) y bupivacaína al 0,2% con NeoSTX 3 µg/kg y epinefrina 5 µg/ml (Figura 4C). Es evidente que la combinación triple proporciona un bloqueo más intenso y prolongado en comparación con la combinación doble. Esto predice que la combinación triple proporcionará un alivio del dolor más intenso y prolongado que la combinación doble, lo cual es particularmente importante en las configuraciones clínicas de "volumen alto" y "volumen medio" descritas anteriormente.

Se utilizó un modelo para el estudio de la toxicidad sistémica. Se usó un modelo de inyección intramuscular (perineural ciática) para simular la toxicidad sistémica en un sitio extravascular, según lo previsto para el bloqueo nervioso o la infiltración en uso clínico. En este modelo, la inyección conjunta de bupivacaína junto con NeoSTX reduce ligeramente la toxicidad sistémica en comparación con animales que reciben la misma dosis de NeoSTX en solución salina. En este modelo, la dosis de bupivacaína está por debajo del rango que produce cardiotoxicidad. El presunto modo de muerte es por debilidad muscular respiratoria y cierta vasodilatación debida a NeoSTX, y la bupivacaína puede reducir la toxicidad sistémica de NeoSTX por vasoconstricción local en el lugar de la inyección, lo que disminuye la absorción sistémica de NeoSTX. Esta conjetura se basa en los efectos vasoconstrictores locales conocidos de la bupivacaína y en experimentos de flujo sanguíneo regionales previos en ratas después de la inyección perineural ciática de otro bloqueador del canal de sodio del sitio 1, tetrodotoxina.

Dado que la co-inyección de bupivacaína aumenta la potencia y la duración del bloqueo nervioso de NeoSTX a la vez que reduce ligeramente su toxicidad sistémica, la combinación NeoSTX-bupivacaína proporciona una mejora significativa en el índice terapéutico en comparación con NeoSTX solo. Una formulación de NeoSTX desarrollada para ensayos clínicos proporciona un bloqueo del nervio ciático de duración más prolongada que la bupivacaína en ratas. La inyección conjunta con bupivacaína mejora la confiabilidad y la duración del bloqueo en comparación con NeoSTX solo.

Ejemplo 2: Estudio clínico de fase I en humanos adultos

5 Investigadores de la Universidad de Chile, Santiago, y una pequeña empresa de biotecnología, Proteus S.A, desarrollaron un proceso en biorreactor para producir NeoSTX de grado clínico de manera eficiente, con excelente pureza, estabilidad, esterilidad y no pirogenicidad. Se realizó una serie de estudios preclínicos de seguridad y toxicológicos en ratones, ratas y ovejas en CHB y Toxikon, Inc. con la supervisión aprobada del IRB regional y del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), la principal agencia reguladora para la aprobación de medicamentos. En Chile, el Dr. Rodríguez-Navarro y sus colegas realizaron dos ensayos voluntarios de Fase 1 (Rodríguez-Navarro, et al., *Anesthesiology*, 106: 339-345, 2009; Rodríguez-Navarro, et al., *Neurotox. Res.*, 2009; 16: 408-415) y dos ensayos de Fase 2 de NeoSTX como anestésico local de duración prolongada para pacientes sometidos a colecistectomía laparoscópica (Rodríguez-Navarro, et al., *Reg. Anesth. Pain Med.*, 2011, 36: 103-109; Rodríguez-Navarro-resumen para presentación en la reunión de ESRA, septiembre de 2010).

15 En los ensayos voluntarios de Fase 1, dosis de 10 o 50 µg produjeron entumecimiento de la piel, con excelente seguridad local y sistémica. Las combinaciones de NeoSTX con bupivacaína o epinefrina intensifican dramáticamente y prolongan la duración del adormecimiento cutáneo en comparación con NeoSTX solo, que a su vez produjo un adormecimiento cutáneo más prolongado que el de la bupivacaína (Rodríguez-Navarro, et al., *Neurotox. Res.*, 2009; 16: 408-15). La adición de epinefrina reduce la toxicidad sistémica y produce una prolongación robusta del bloqueo sensorial.

25 En dos ensayos de Fase 2, ensayos de superioridad doble ciego de pacientes sometidos a colecistectomía laparoscópica bajo anestesia general, comparando 100 µg de NeoSTX con bupivacaína para la infiltración de los sitios de entrada, NeoSTX proporcionó una analgesia más prolongada que la bupivacaína y los pacientes lo calificaron globalmente como una recuperación postoperatoria más rápida. Hasta la fecha, 181 pacientes en Chile han recibido NeoSTX en ensayos clínicos sin ningún evento adverso grave.

30 Estudios recientes en humanos han demostrado la potencia, la seguridad y los efectos analgésicos prolongados de NeoSTX mediante infiltración en la piel con 10 µg o 50 µg en estudios de Fase 1 con voluntarios despiertos e infiltración de la capa de la herida con 100 µg en los estudios de Fase 2 con pacientes sometidos a colecistectomía laparoscópica bajo anestesia endotraqueal general.

35 En los voluntarios despiertos, no hubo informes de debilidad y no hubo signos de anomalías respiratorias o hemodinámicas, pero no se realizaron medidas sustitutas detalladas de los efectos subclínicos sistémicos.

40 En los pacientes en los ensayos de colecistectomía laparoscópica con comparación doble ciego con bupivacaína, las inyecciones se realizaron bajo anestesia endotraqueal general con ventilación controlada. Por tanto, no se pudieron evaluar los efectos inmediatos sobre los síntomas y la fuerza muscular respiratoria. Sin embargo, todos los sujetos mostraron un excelente esfuerzo respiratorio al final de la cirugía y ninguno de ellos tuvo un retraso en la extubación (la duración de la cirugía fue de aproximadamente 1 hora) y no se observaron signos de debilidad o hipoventilación en la observación prolongada en la Unidad de Atención postanestesia (PACU).

45 Sin embargo, a pesar de que estos estudios de Fase 2 en pacientes quirúrgicos sugieren una buena seguridad sistémica para NeoSTX a dosis de 100 µg en sujetos anestesiados y ventilados mecánicamente, era esencial realizar estudios adicionales de Fase 1 en estudios de dosis comenzando con dosis más pequeñas y usan más medidas sustitutas precisas de los efectos sistémicos subclínicos para seleccionar una dosis segura (con un umbral mínimo de eventos adversos) en sujetos jóvenes adultos despiertos.

50 Materiales y métodos

El objetivo principal de este estudio de Fase 1 era evaluar la seguridad sistémica de la neosaxitoxina (NeoSTX), administrada mediante inyección subcutánea en combinación con el anestésico local bupivacaína y epinefrina, de uso común. Los objetivos secundarios de este estudio de Fase 1 fueron establecer la dependencia a la dosis de la intensidad y duración del bloqueo sensorial cutáneo (entumecimiento a los estímulos térmicos y mecánicos) de NeoSTX en solución salina en comparación con NeoSTX en combinación con bupivacaína y epinefrina, para establecer la seguridad local y tolerabilidad de NeoSTX cuando se administra mediante inyección subcutánea y para medir la farmacocinética de NeoSTX después de inyección subcutánea. Se realizó un estudio de Fase I bajo un FDA IND iniciado por un investigador para establecer aún más la seguridad sistémica y local y la respuesta a la dosis para el bloqueo sensorial cutáneo de NeoSTX por infiltración subcutánea en sujetos adultos jóvenes voluntarios humanos sanos.

65 Como se detalla a continuación, el hormigueo de los labios, la lengua y los dedos se produce a dosis que parecen fisiológicamente muy seguras. Esta enmienda al protocolo refleja la expectativa de que NeoSTX se usaría en dos rangos de dosis en estudios de Fase 2 subsiguientes: uno que produce síntomas sistémicos mínimos en sujetos despiertos y un segundo rango de dosis algo mayor destinado al uso en sujetos sedados o anestesiados en una sala de operaciones. Esta enmienda implica la administración de dosis a sujetos en una sala de operaciones y permite

- que los sujetos reciban bajas dosis de ansiolisis con midazolam si el hormigueo se percibe como intenso o muy molesto. Por tanto, es importante definir la seguridad en un rango de dosis en que el medicamento se usa en una sala de operaciones. Se utilizará un diseño de aumento de dosis secuencial con grupos de 9 sujetos en cada paso de la dosis. De forma doble ciega, cada sujeto recibió dos inyecciones simultáneamente en un área cuadrada de 3 cm x 3 cm en la piel de la cara posterior de la parte inferior de la pierna (pantorrilla), una en cada lado, en un diseño de bloques al azar. Cada sujeto recibió una inyección con bupivacaína 0,2% solo en un lado. Por otro lado, recibieron una de 2 soluciones posibles: (1) placebo de solución salina o (2) NeoSTX en combinación con bupivacaína y epinefrina. En cada grupo de dosis, solo una de las inyecciones incluye placebo.
- Los sujetos de prueba eran hombres adultos jóvenes. La infiltración subcutánea se realizó con una aguja de calibre 25 1/2 pulgada. El volumen de 10 ml se distribuyó de manera que se administraron 2 ml vía subcutánea en cada uno de los lados del cuadrado de 3 x 3 cm y 2 ml a lo largo de la diagonal.
- Los individuos recibieron NeoSTX a una dosis de 5, 10, 15, 20, 30 o 40 µg, bupivacaína al 0,2% y 5 µg de epinefrina/ml. La epinefrina se añadió rutinariamente a las inyecciones de anestésicos locales por dos razones: (1) para reducir la absorción sistémica y reducir las concentraciones sistémicas en sangre y reducir así los riesgos de toxicidad sistémica, y (2) para prolongar la duración de la anestesia local.
- El uso de un diseño de dosificación pareada dentro del sujeto con bupivacaína en un lado y NeoSTX en solución salina o NeoSTX en bupivacaína en el otro lado permite comparar en un mismo sujeto la intensidad y la duración de la analgesia cutánea a dosis crecientes de NeoSTX con o sin concentración fija de bupivacaína 0,2%, en comparación con el estándar utilizado actualmente, bupivacaína 0,2%.
- La medida resultado primaria de este estudio de Fase I es la ausencia o presencia de, la frecuencia y el grado de EA como se define en 21 CFR 312.32 en función de NeoSTX en cada etapa de dosis, administrada con o sin bupivacaína. Estos eventos adversos miden los efectos sistémicos de NeoSTX.
- El diseño pretende definir un umbral para los efectos sistémicos al tiempo que reduce la probabilidad de eventos adversos y eventos adversos graves.
- Un evento adverso (EA) se refiere a cualquier ocurrencia médica adversa asociada al uso de neosaxitoxina en humanos, ya sea se considere relacionada o no con el fármaco, como se describe en 21 CFR 312.32. La intensidad (grado) de cada EA se evaluó utilizando la siguiente escala:
- Grado 1 (leve): experiencias que generalmente son transitorias, no requieren tratamiento especial y no interfieren con las actividades diarias del sujeto.
- Grado 2 (Moderado): experiencias que introducen cierto nivel de inconveniencia o conciernen al sujeto y pueden interferir un poco con las actividades diarias, pero generalmente mejoran con medidas terapéuticas simples (pueden incluir terapia con medicamentos).
- Grado 3 (grave): experiencias que son inaceptables o intolerables, interrumpen significativamente la actividad diaria habitual del sujeto y requieren una terapia farmacológica sistémica u otro tratamiento.
- Grado 4 (peligro de muerte): experiencias que causan que el sujeto se encuentre en peligro inminente de muerte.
- Grado 5 (Muerte): fatalidad del sujeto
- Resultados para NeoSTX en combinación con bupivacaína y epinefrina
- Se completó una evaluación completa de cohortes de dosis a nivel de 5 µg, 10 µg, 15 µg, 20 µg y 30 µg y la cohorte de 40 µg (n = 10, todavía en proceso) casi se había completado. A la dosis de 40 µg se observó una alta tasa de efectos sistémicos en sujetos despiertos. Como anteriormente, estos efectos implican síntomas sistémicos (hormigueo y entumecimiento, y ahora náuseas), pero no signos de riesgo fisiológico inminente. La presencia de náuseas y vómitos durante un breve período de tiempo (una hora) después de la inyección también se observó en 8/10 pacientes. Hasta la fecha, los pacientes han calificado esto como un poco molesto. No hubo alteración de la oxigenación o ventilación, incapacidad de la fuerza inspiratoria o capacidad vital (fuerza muscular respiratoria) ni alteración de la fuerza de agarre, ni cambios en el ritmo cardíaco ni hipotensión.
- En el futuro uso clínico para la infiltración, es probable que se utilicen mayores volúmenes de inyección, por ejemplo de 30 µl. En principio, para bloquear un campo quirúrgico que es tres veces más grande se requiere aproximadamente tres veces el volumen inyectado de anestésico local y, por tanto, tres veces la dosis de anestésico local cuando se administra a una concentración fija. La seguridad sistémica varía con la dosis total, mientras que la eficacia y la duración locales varían con las concentraciones locales de medicamentos. El estudio mostró que NeoSTX 30 µg es una dosis segura en estos voluntarios.

A una dosis total de 10 µg en el inyectado de 10 ml, la concentración local de NeoSTX es igual a la concentración esperada cuando se usa para la infiltración de heridas en un volumen de 30 ml.

5 El grupo de dosis alta NeoSTX (30 µg) proporciona la dosis total máxima para los viales de 30 ml propuestos para la futura infiltración de analgesia.

10 Las figuras 5A y 5B muestran el grado de bloqueo sensorial. El eje Y muestra los umbrales de detección mecánica utilizando filamentos de Von Frey. Los números de Von Frey están relacionados logarítmicamente con los gramos de fuerza aplicados. Los números > 16 representaban un bloqueo sensorial bastante denso. Los números 10 a 14 representan un bloqueo parcial y probablemente aún contribuyan a un grado de analgesia postoperatoria. El eje X es el tiempo después de la inyección. Las barras de error muestran la SD.

15 La Figura 6 es una gráfica del porcentaje de sujetos que tienen síntomas sistémicos: hormigueo, entumecimiento, mareos, náuseas o vómitos en cualquier momento posterior a la administración de 0, 5, 10, 15, 20, 30 o 40 µg de NeoSTX-bupivacaína-epinefrina. Se observaron náuseas en el 80% de los sujetos a 40 µg de NeoSTX. Ningún sujeto requirió intervención médica u oxígeno suplementario. 02 sat, BP, NIF, VC, fuerza de agarre, ECG muy tranquilizador. Para NeoSTX-salino y NeoSTX-bupivacaína, el cosquilleo leve y transitorio de los labios, la lengua y las yemas de los dedos comenzó con 10 µg, con un aumento del hormigueo en la escala de 40 µg. Náuseas y emesis transitorias a 40 µg. Los síntomas generalmente se resuelven en 1 hora. No se observaron secuelas locales o sistémicas.

20 Las Figuras 7A y 7B son gráficas de medida del umbral de bloqueo denso y parcial mecánico (Figura 7A) y detección de frío (Figura 7B) para NeoSTX, NeoSTX + bupivacaína, NeoSTX + bupivacaína + epinefrina, comparado con placebo y controles (sin NeoSTX), con el tiempo en horas.

25 NeoSTX-bupivacaína produce bloqueos mecánicos y térmicos más largos que NeoSTX-solo o bupivacaína sola. NeoSTX-bupivacaína proporciona anestesia quirúrgica confiable durante 12 horas, analgesia fuerte y confiable durante más de 24 horas.

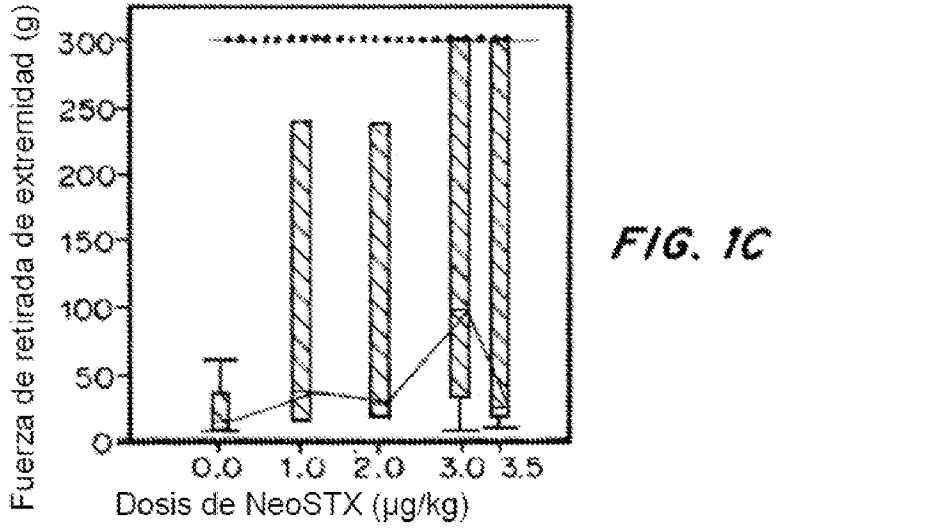
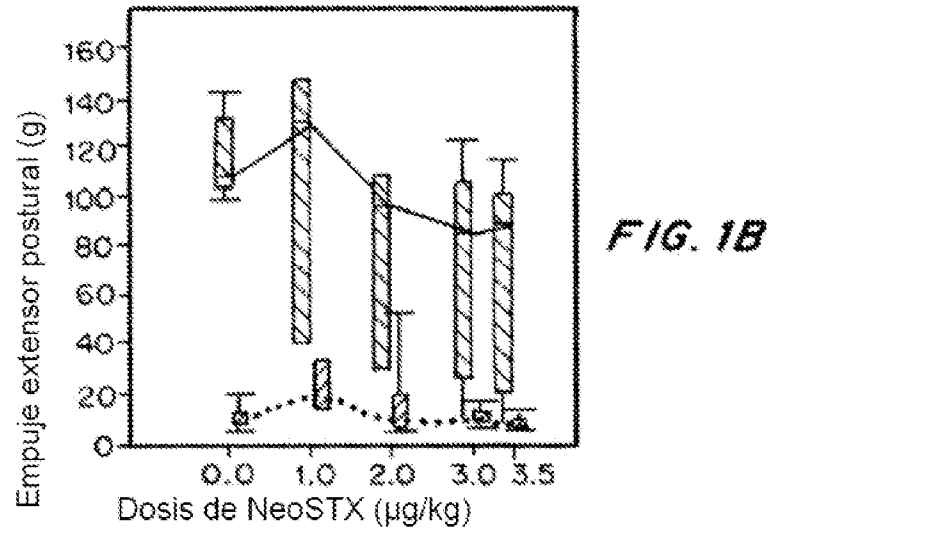
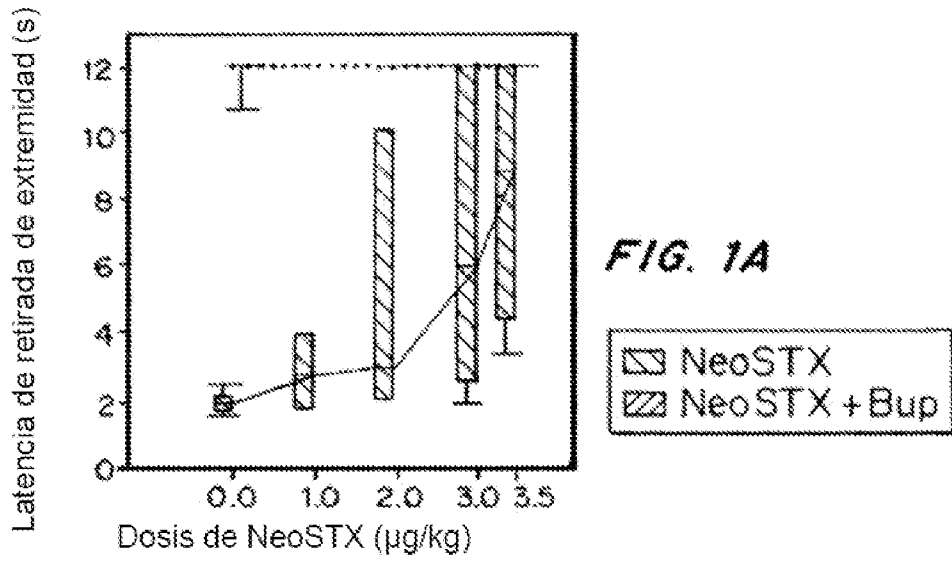
30 En base a la recuperación del bloqueo mecánico parcial, se predice que si estas formulaciones se usan para el bloqueo nervioso periférico, el bloqueo motor no persistirá durante más de 24 horas, lo que es deseable. En base a la recuperación del bloqueo mecánico parcial antes de la recuperación del bloqueo de detección térmica parcial (que se correlaciona con la sensación de dolor), se prevé un período prolongado de analgesia en el rango de 24 a 48 horas o incluso más, con la recuperación del tacto parcial y la función motora en 24 horas.

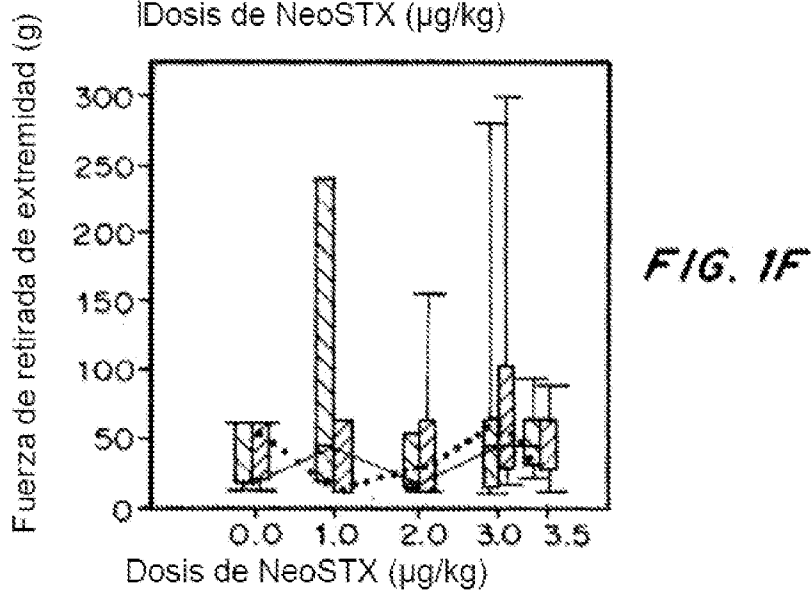
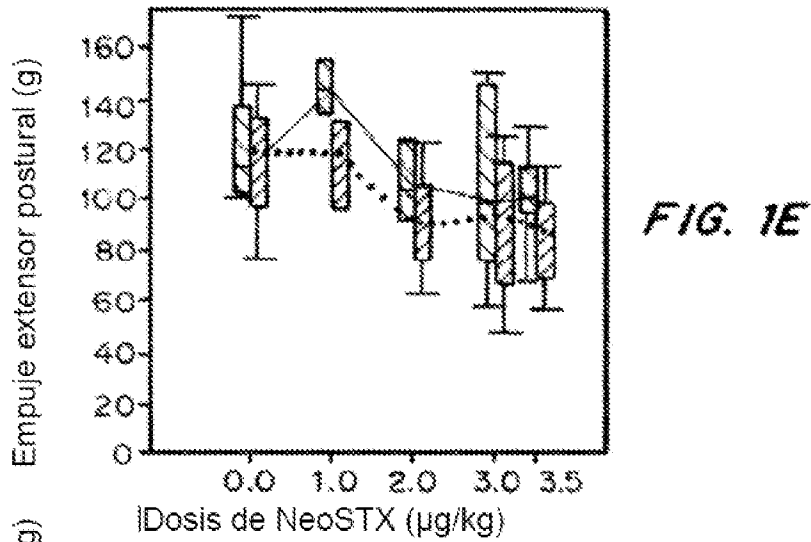
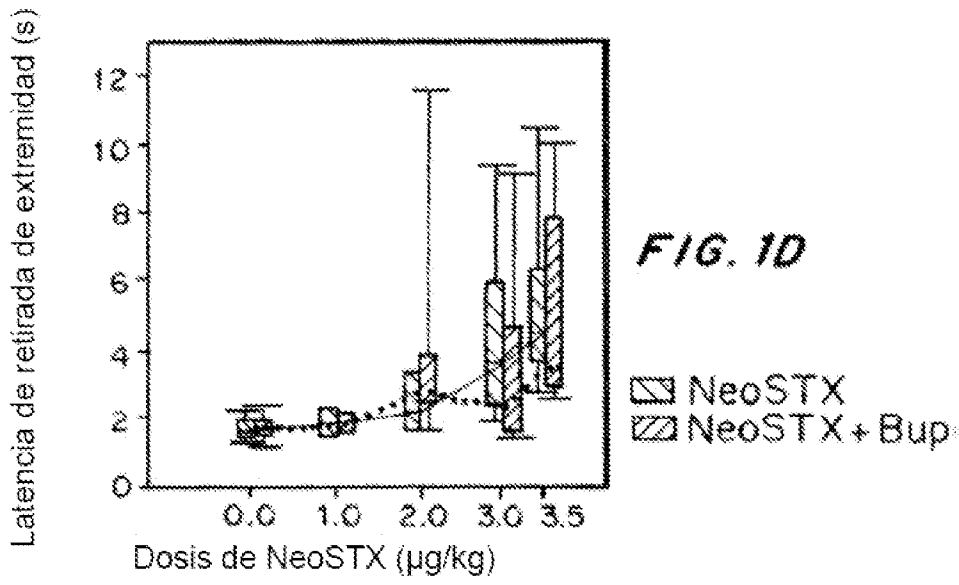
35 NeoSTX-bupivacaína-epinefrina produjo bloqueos mecánicos y térmicos más largos que NeoSTX-bupivacaína, NeoSTX o bupivacaína. NeoSTX-bupivacaína proporciona anestesia quirúrgica confiable/analgesia muy densa durante al menos 24 horas. Según la duración del bloqueo de detección térmica parcial (que se correlaciona con la sensación de dolor), se predice un período prolongado de analgesia postoperatoria en el rango de 48 a 72 horas o incluso más.

40

REIVINDICACIONES

1. Unidad de dosificación adecuada para el tratamiento o la prevención del dolor
- 5 (i) en adultos, en la que la unidad de dosificación tiene un volumen de 20-40 ml, y en la que la unidad de dosificación comprende 8-20 μg de neosaxitoxina a una concentración de 0,3-0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, comprende bupivacaína a una concentración del 0,15-0,25% (1,5-2,5 mg/ml) y no comprende epinefrina; o
- 10 (ii) en niños, en la que la unidad de dosificación tiene un volumen de 0,3-0,5 ml por kg de peso corporal del niño, y en la que la unidad de dosificación comprende 0,1-0,3 μg de neosaxitoxina por kg de peso corporal del niño a una concentración de 0,3-0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, comprende bupivacaína a una concentración del 0,15-0,25% (1,5-2,5 mg/ml) y no comprende epinefrina; o
- 15 (iii) en la que la unidad de dosificación comprende 5-10 μg de neosaxitoxina a una concentración de 0,5-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, comprende bupivacaína a una concentración del 0,2% y no comprende epinefrina; o
- (iv) en la que la unidad de dosificación tiene un volumen de inyección de 10 ml, comprende neosaxitoxina a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y comprende bupivacaína.
- 20 2. Unidad de dosificación según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento o la prevención del dolor en un ser humano despierto.
3. Unidad de dosificación para su uso según la reivindicación 2, en la que se aplica la opción (i) o (ii) de la reivindicación 1, y en la que la unidad de dosificación se administra en una cantidad efectiva para bloqueos de nervios periféricos y bloqueos del plexo con efectos motores en brazos y piernas, permitiendo la recuperación del bloqueo motor 24-48 horas tras la administración.
- 25





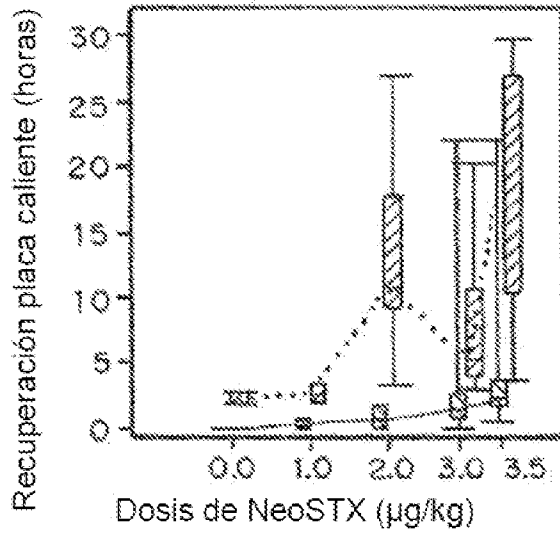


FIG. 2A

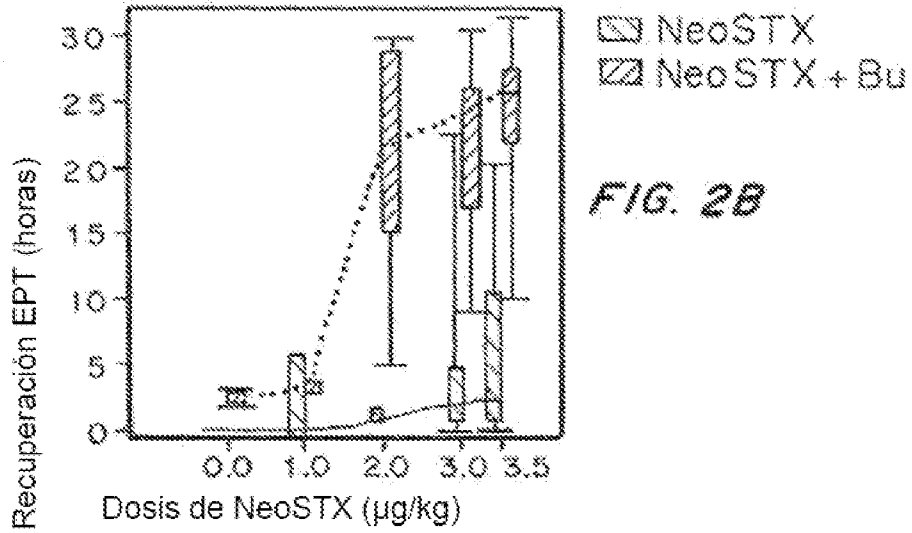


FIG. 2B

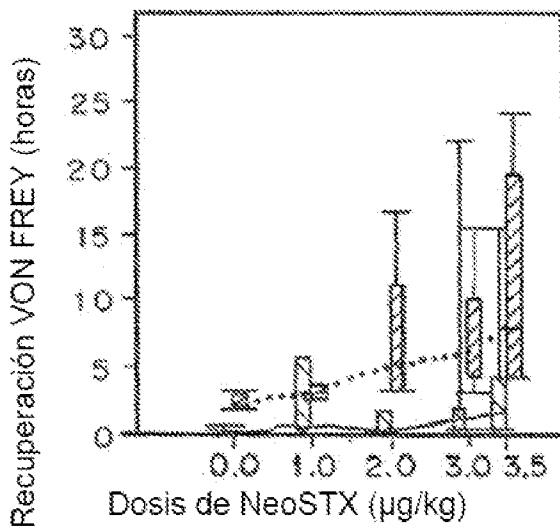


FIG. 2C

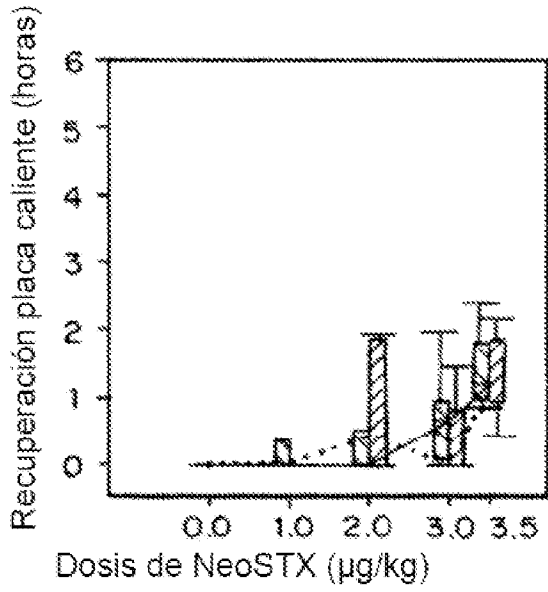


FIG. 2D

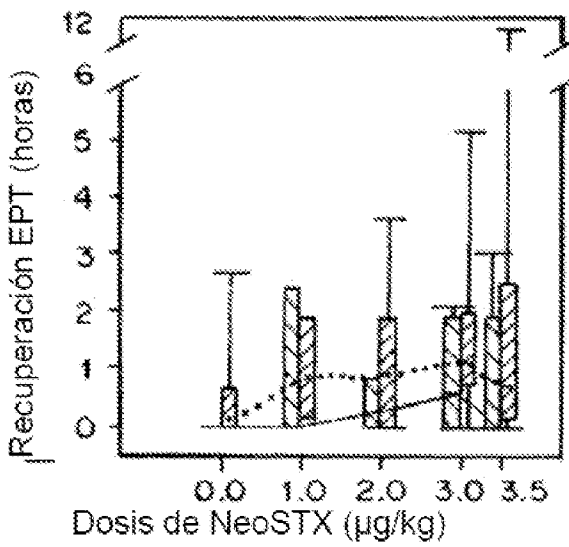


FIG. 2E

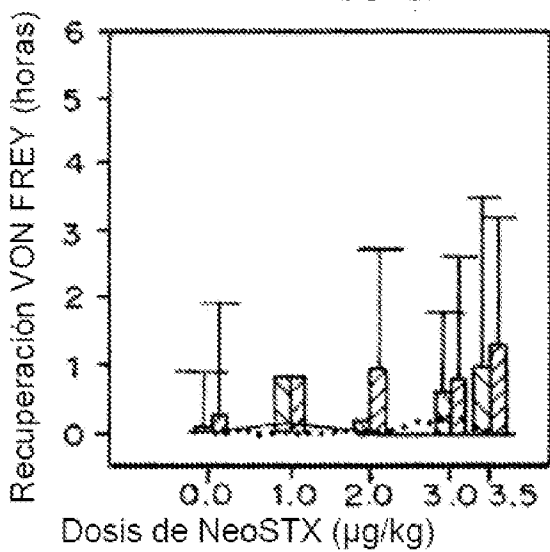


FIG. 2F

Probabilidad de muerte en base a dosis de Neosaxitoxina estratificada con NeoSTX fórmula y uso de Bupivacaína

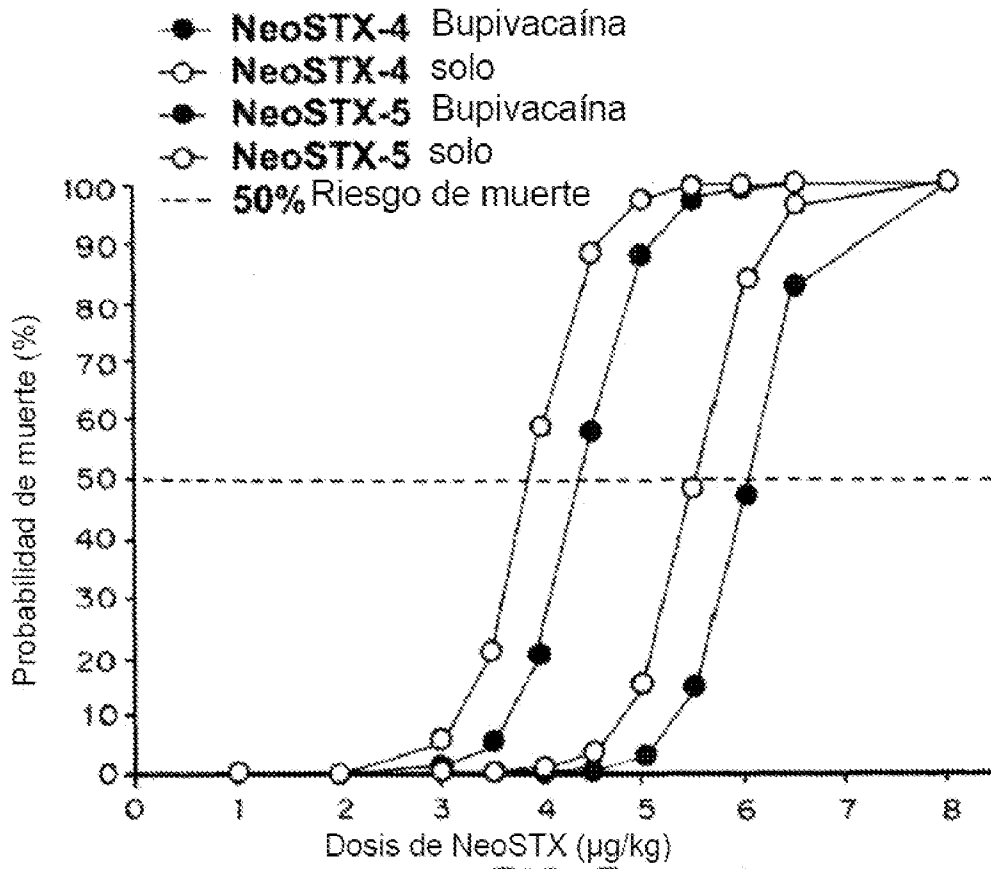


FIG. 3

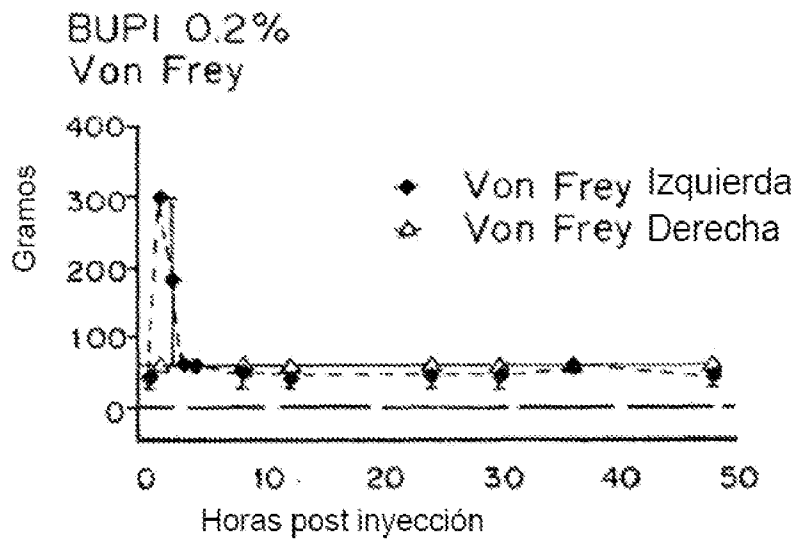


FIG. 4A

BUPI 0.2% + NeoSTX 3µg/kg

Von Frey

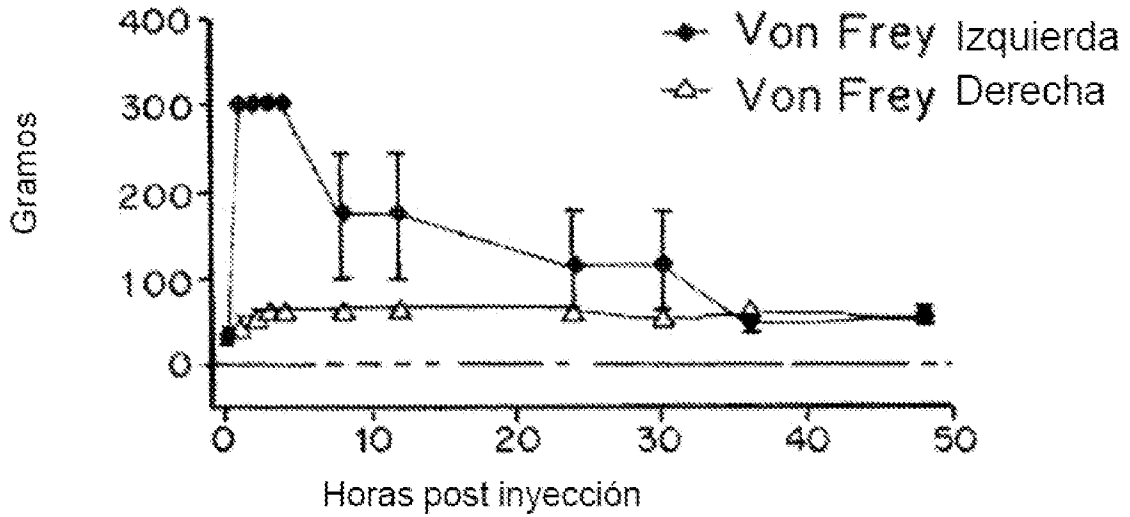


FIG. 4B

BUPI 0.2% + NeoSTX 3µg/kg + [EPI final]
5µg/mL

Von Frey

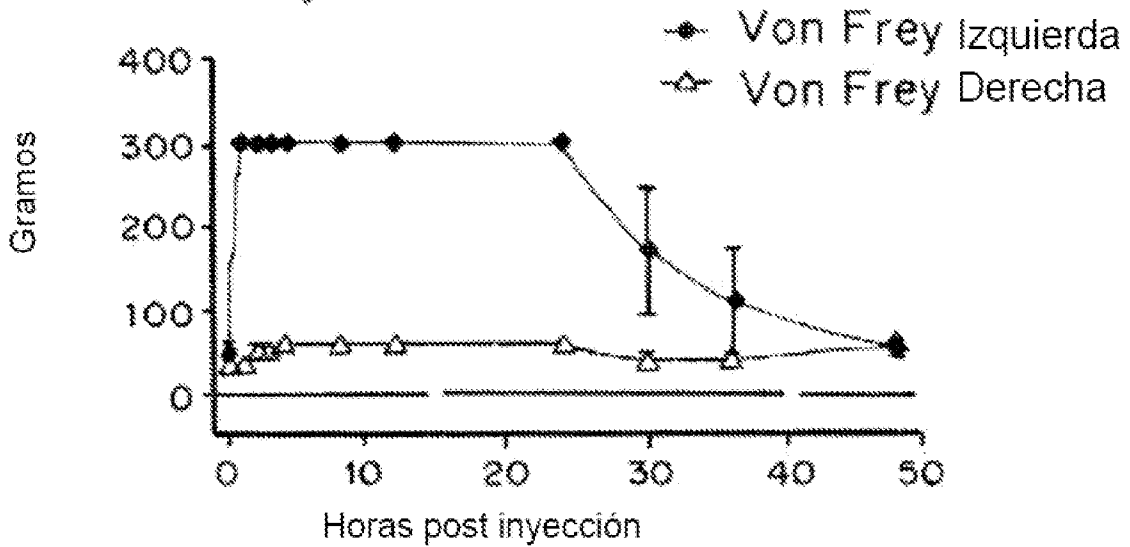


FIG. 4C

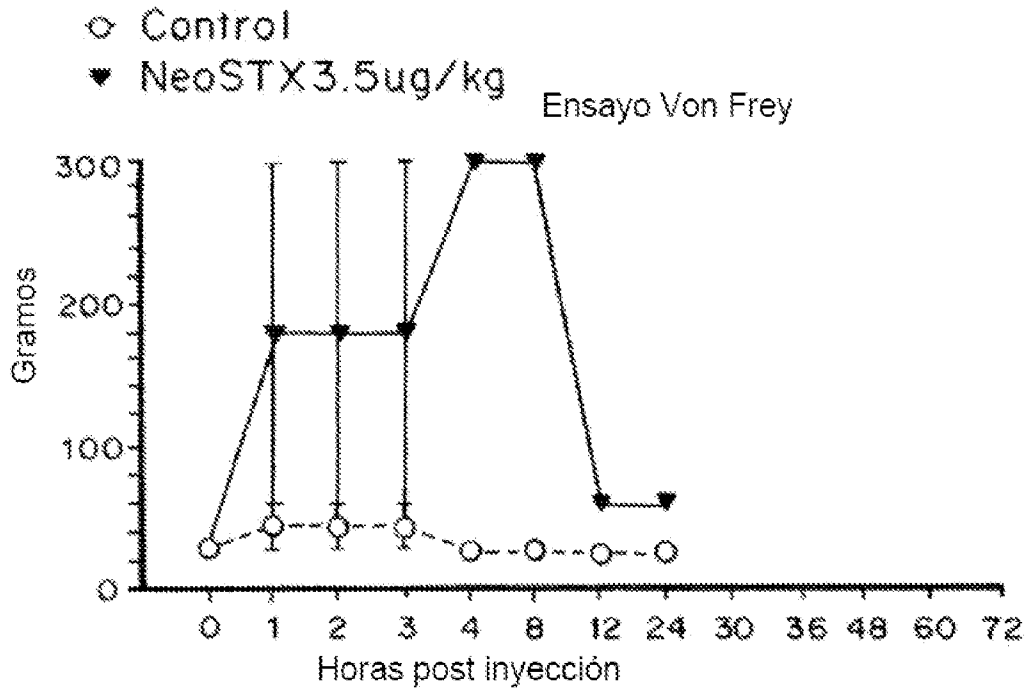


FIG. 5A

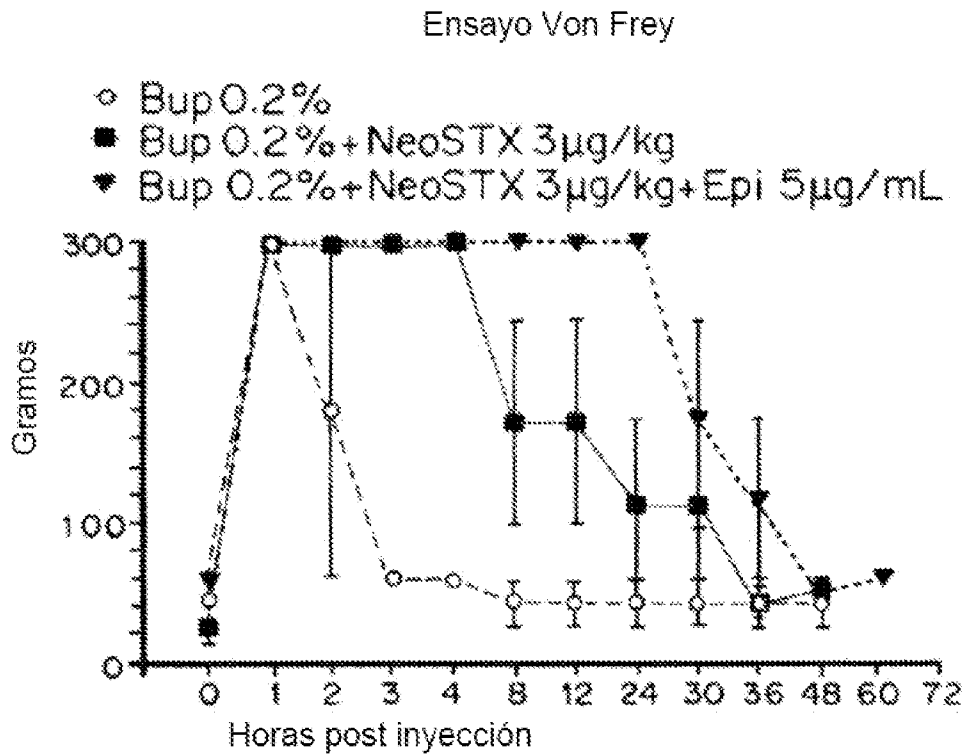


FIG. 5B

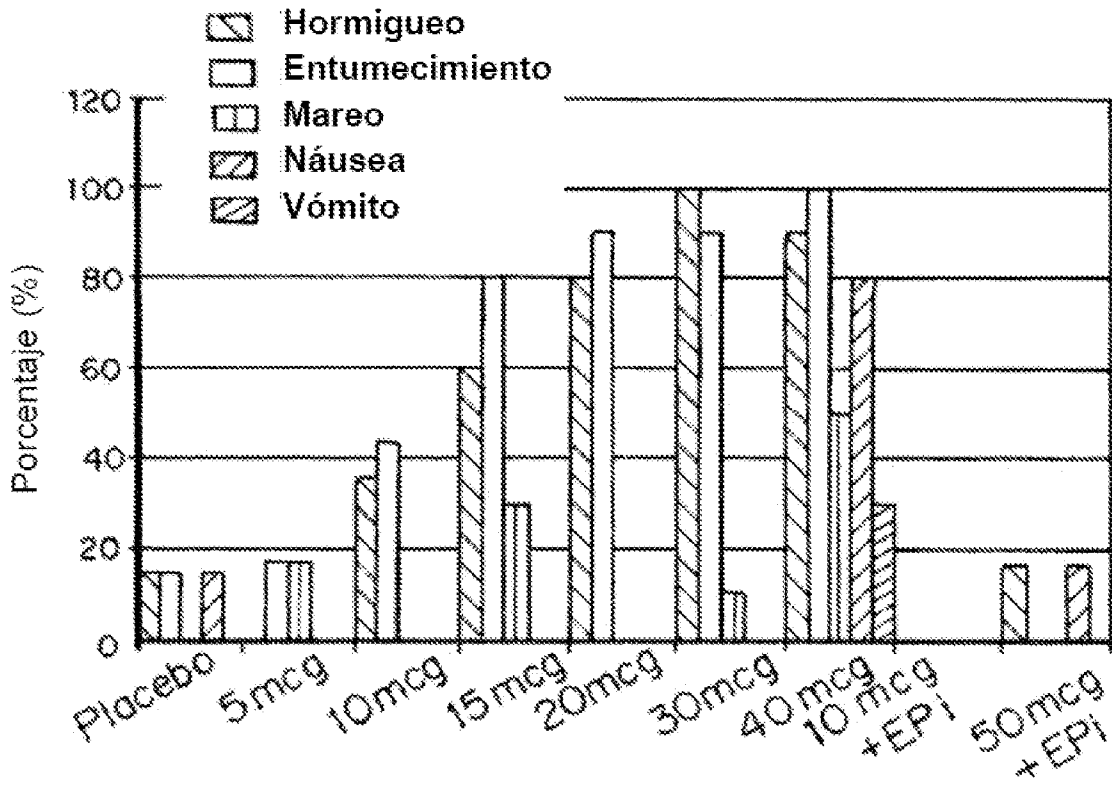


FIG. 6A

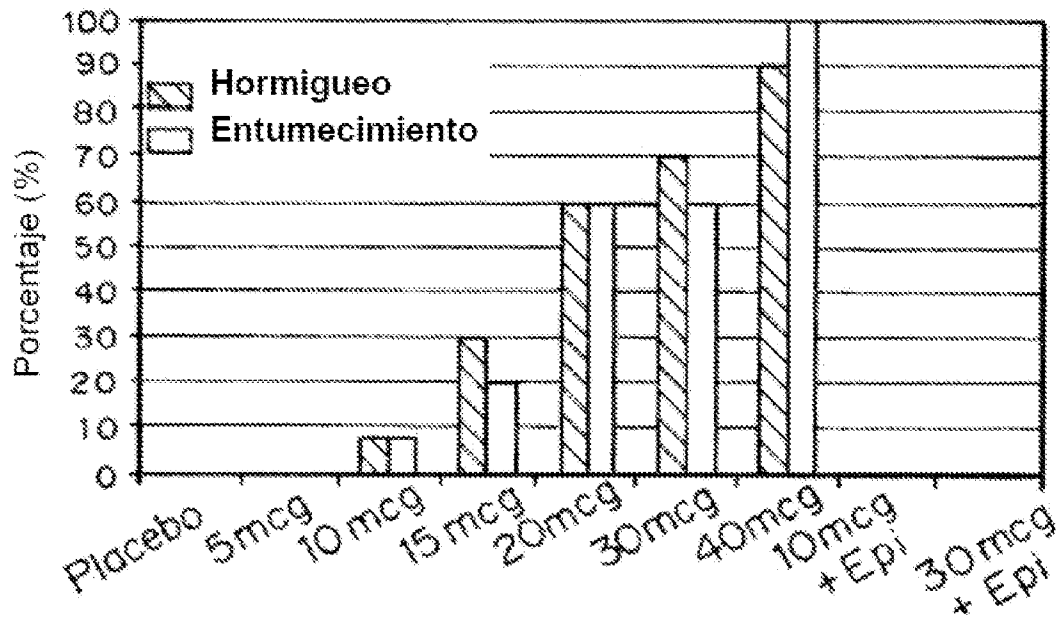


FIG. 6B

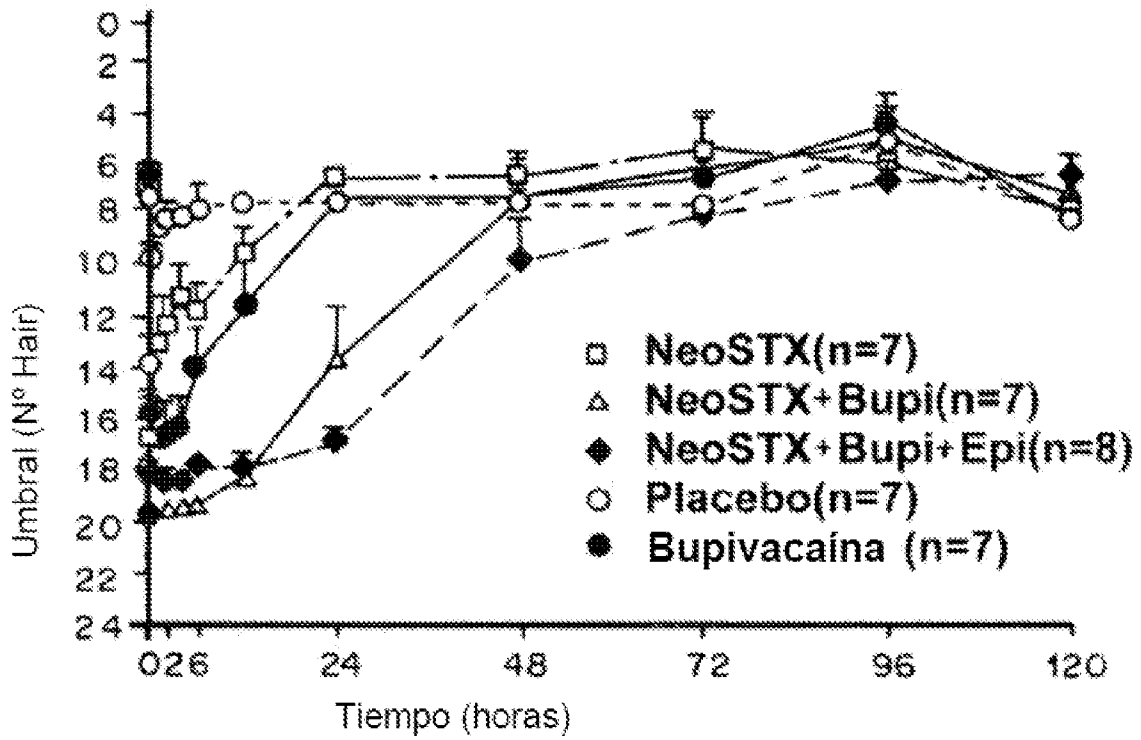


FIG. 7A

NeoSTX 10 mcg

Dolor mecánico

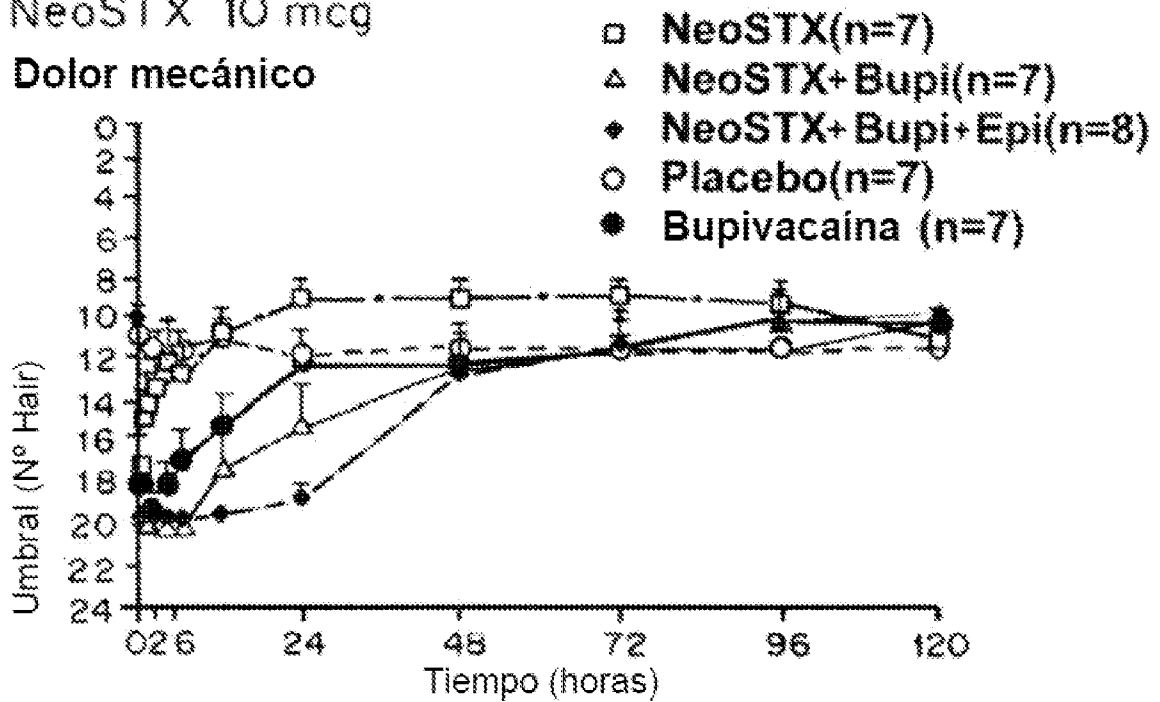


FIG. 7B

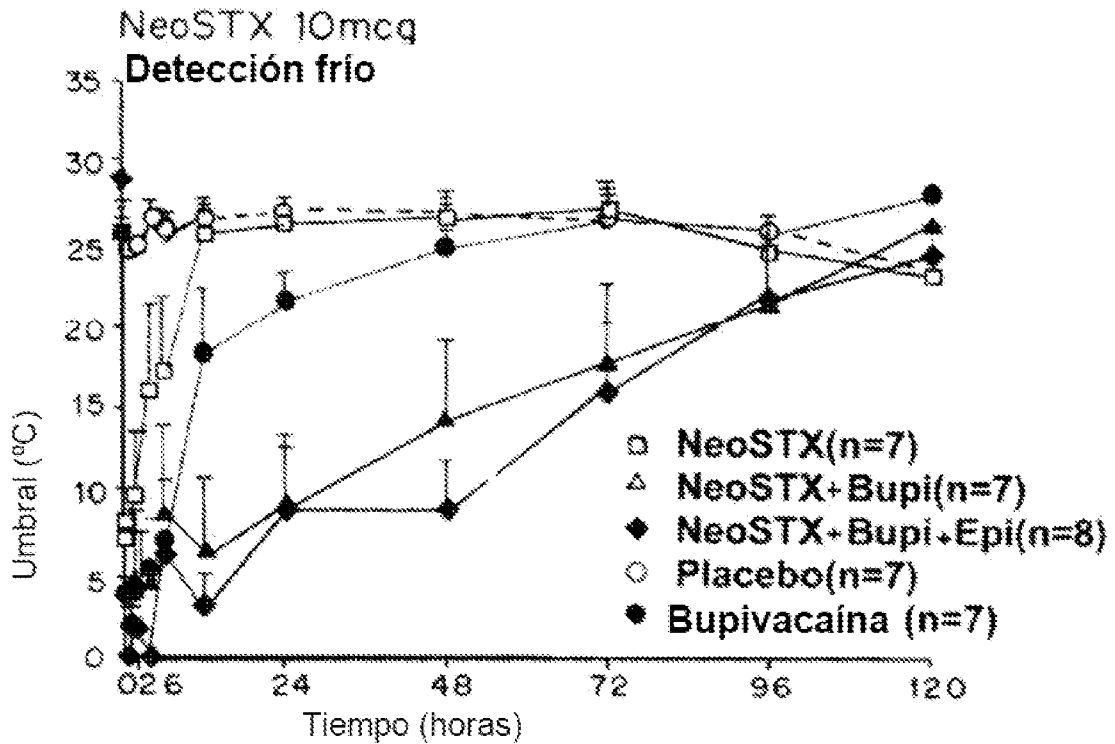


FIG. 7C

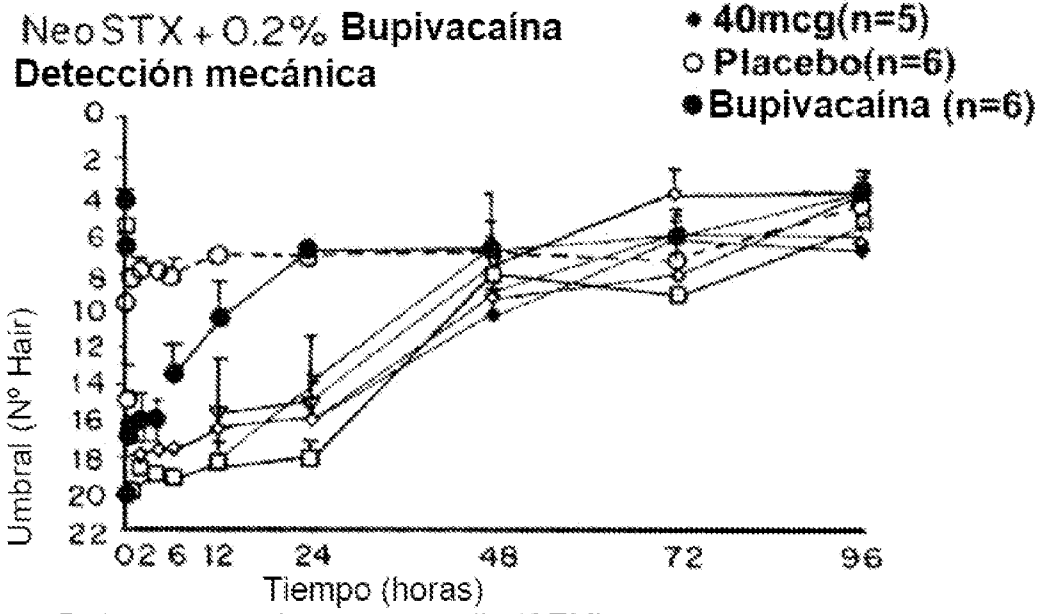


FIG. 8A

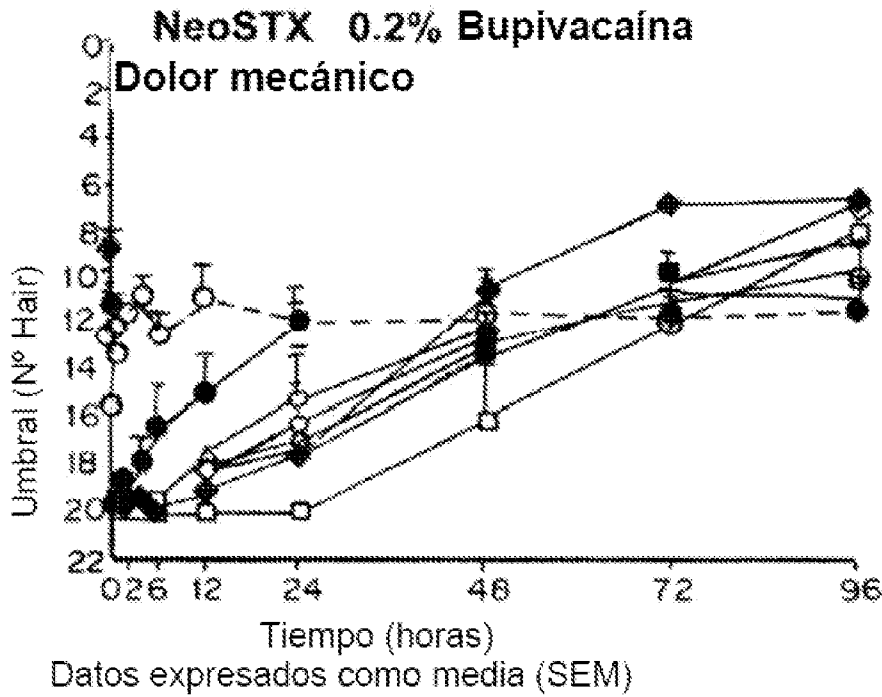


FIG. 8B

- 5mcg(n=3)
- △ 10mcg(n=7)
- ◇ 15mcg(n=5)
- 20mcg(n=5)
- ▽ 30mcg(n=5)
- ◆ 40mcg(n=5)
- Placebo(n=6)
- Bupivacaína (n=6)

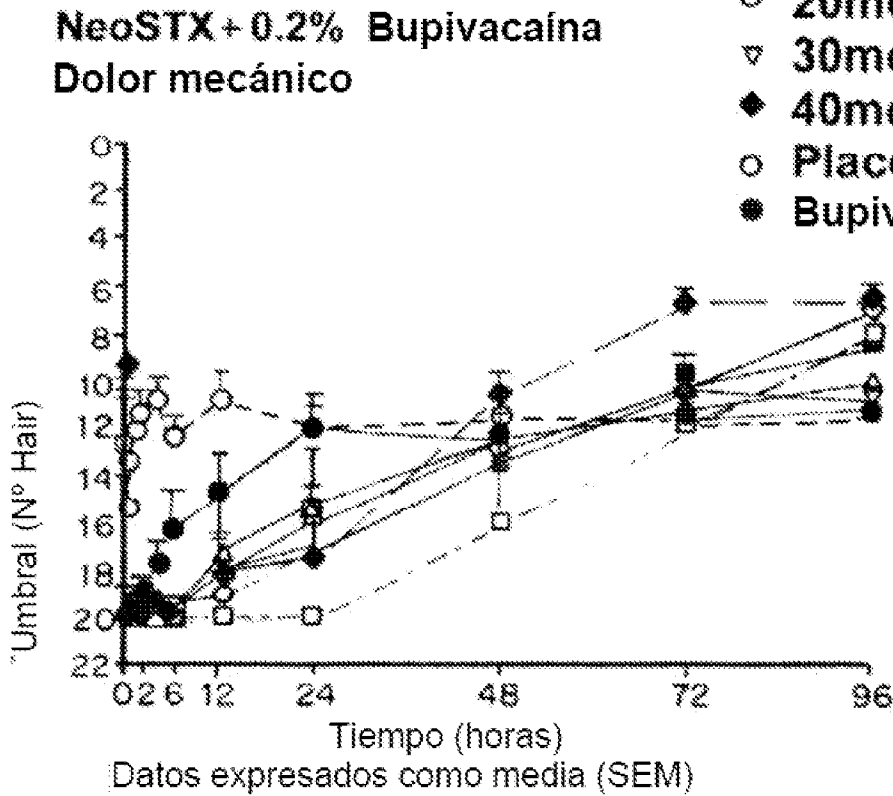


FIG. 8C