

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 757**

51 Int. Cl.:

A61K 38/07 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2017 PCT/SG2017/050210**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17180064**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2017 E 17782756 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2022 EP 3442557**

54 Título: **Una formulación de fármaco para uso en el control eficaz del dolor agudo y/o crónico**

30 Prioridad:

14.04.2016 SG 10201602973W

12.08.2016 RU 2016133329

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

21.12.2022

73 Titular/es:

PVP LABS PTE. LTD. (100.0%)

1 Coleman Street 10-06

The Adelphi, Singapore 179803, SG

72 Inventor/es:

KOSORUKOV, VYACHESLAV STANISLAVOVICH;

RZHANINOV, EVGENY STANISLAVOVICH y

KOROBV, NIKOLAI VASILIEVICH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 930 757 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

Una formulación de fármaco para uso en el control eficaz del dolor agudo y/o crónico

Campo técnico

5 La invención se refiere a los campos de la medicina médica y veterinaria, en particular, como medio para el control eficaz del dolor agudo y/o crónico. La invención se puede utilizar en la medicina de urgencia y en el tratamiento del dolor agudo y/o crónico, incluidas los últimos estadios del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 La siguiente discusión de los antecedentes de la invención pretende facilitar la comprensión de la presente invención. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la discusión no es un reconocimiento o admisión de que el material al que se hace referencia haya sido publicado, conocido o parte del conocimiento general común en ninguna jurisdicción en la fecha de prioridad de la solicitud.

15 Se presentan enfoques clásicos en la terapia de alivio del dolor agudo, basados en la búsqueda de ligandos que interactúen con los receptores opioides (RO) en el cuerpo humano. Hay tres grupos principales de RO: receptores μ (μ), delta (δ) y kappa (κ). Se cree que los principales responsables del efecto analgésico son los receptores μ , mientras que δ y κ tienen diferentes efectos fisiológicos: analgésico, eufórico, disfórico, depresión respiratoria, etc.

20 A menudo, en los pacientes con estadios generalizados de cáncer se observa una combinación de varios tipos de dolor, ya que son las fuentes del dolor. Por lo tanto, el dolor es bastante diverso en sus manifestaciones clínicas, pero tiene características comunes: es constante y, por regla general, también es de naturaleza progresiva. En algunos pacientes, el dolor es el resultado del crecimiento del tumor o su diseminación a otros órganos. En otros casos, el dolor puede ocurrir debido a complicaciones del tratamiento del cáncer. Aproximadamente 3,5 millones de pacientes sufren dolores diarios de intensidad variable. Según las estadísticas, aproximadamente el 40% de los pacientes con estadios intermedios de la enfermedad y el 60-87% de la generalización de la enfermedad experimentan dolor que varía de leve a intenso.

25 En los casos de manifestaciones de dolor menores o medias, tanto periódicas como crónicas, se utilizan medicamentos de primer y segundo orden: medicamentos no narcóticos (no opioides), antiinflamatorios no esteroideos u opioides débiles (codeína, dionina, Tramal). Los analgésicos no narcóticos no tienen efecto sobre el sistema respiratorio, no provocan euforia ni dependencia física ni psíquica. Sin embargo, su actividad analgésica se manifiesta principalmente con dolor neurálgico, muscular, articular, dolor de cabeza, dolor de muelas. En los casos de dolor intenso asociado a lesiones, cirugía, tumores malignos, etc., suelen ser ineficaces. Otro efecto secundario indeseable de estos medicamentos es el efecto negativo sobre el tracto gastrointestinal, el sistema hematopoyético y el sistema excretor.

35 Con el tiempo, los pacientes con cáncer, que han estado recibiendo medicamentos relativamente débiles, descubren que dejan de tener un efecto pronunciado. En tales casos, se prescribe el uso de medicamentos a base de opioides. El grupo de analgésicos narcóticos de bajo peso molecular (morfina y sus derivados) se caracteriza por un fuerte efecto analgésico, lo que permite su uso en caso de lesiones y enfermedades acompañadas de dolor intenso (cáncer, infarto de miocardio, etc.). A pesar de esto, este grupo tiene una gran desventaja: tienen efecto sobre el sistema nervioso central, que se manifiesta en el desarrollo de euforia, y cuando hay un uso repetido, se observan síndromes adictivos, como resultado de la dependencia psíquica y física. No es ningún secreto que esta propiedad hace posible su uso como drogas callejeras y, debido a este problema, este grupo de fármacos está bajo un estricto control por parte de los gobiernos para evitar el tráfico de drogas. Otro factor negativo es el rango terapéutico relativamente estrecho de las dosis administradas. El riesgo de efectos adversos, como depresión respiratoria y pérdida del conocimiento, puede tener consecuencias graves, incluida la muerte.

La búsqueda de nuevos analgésicos es un problema de gran actualidad de la farmacología moderna aplicada al tratamiento del dolor, principalmente porque los analgésicos no tienen el equilibrio necesario de eficacia y seguridad.

45 La búsqueda de fármacos analgésicos basados en péptidos es un problema interesante y desafiante en la farmacología experimental moderna. De hecho, la esencia de los péptidos endógenos naturales de este grupo de fármacos es potencialmente muy eficaz y selectiva para la determinación de las actividades analgésicas y eufóricas. Las características de la estructura química de varios aminoácidos no permiten modificar químicamente un fármaco basado en péptidos para inducir euforia.

50 Hay varios estudios conocidos en los que se han probado varias sustancias para determinar la presencia de actividad analgésica basada en péptidos. Entre los péptidos analgésicos endógenos se encuentran la beta-endorfina, la met-enkefalina, la leu-enkefalina, la dinorfina A. Sin embargo, los fármacos no son prácticos de usar, debido a sus características bioquímicas y a que son moléculas grandes.

55 En la década de 1980, se descubrió un péptido natural que tiene afinidad hacia el receptor opioide: la dermorfina. Se han estudiado varias formas y modificaciones de péptidos derivados de dermorfina.

El 10 de agosto de 1999 se expidió un heptapéptido conocido que tiene actividad analgésica, combinada con una actividad termorreguladora y/o vasomotora y/o un impacto sobre la respuesta conductual de un sujeto, y la forma de cambiar la actividad fisiológica de la dermorfina (Patente n.º 2134121), y que tiene las propiedades de los analgésicos endógenos. El uso de este péptido proporciona un cambio en el nivel de actividad analgésica y la fuente termorreguladora de la dermorfina. Sin embargo, se ha demostrado que el nivel de actividad analgésica de la dermorfina que se ha modificado de esta manera no es suficientemente alto.

Al mismo tiempo, según los estudios anteriores dedicados a este tema, se descubrió que el requisito mínimo para una secuencia completa de dermorfina con respecto a su actividad analgésica estaba representado por un tetrapéptido N-terminal en el que se requería la presencia de un residuo de D-Ala [1].

Además, se demostró que la D-Arg2-dermorfina y los análogos del tetrapéptido N-terminal eran resistentes a la escisión y un péptido tiene un potente efecto antinociceptivo [2]. Se observó que el tetrapéptido H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH era el más resistente a la escisión

Dada la importancia potencial de esta clase de tetrapéptidos para las aplicaciones clínicas, se presentaron varias solicitudes de invenciones, el documento JPS58213743 A publicado el 12-12-1983 y el documento JPS6054400 A publicado el 28-03-1985.

La solicitud JPS58213743 A relativa a la posibilidad de obtener tetrapéptidos, en particular, H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH, indicaron su actividad potencial asociada con los receptores opioides.

La solicitud JPS6054400 A indicó la actividad analgésica de los tetrapéptidos. En particular, dada la presencia de una acción analgésica pronunciada del tetrapéptido Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ (más de 6 veces la actividad de la morfina). Este péptido se administró por vía subcutánea a ratones en un estado de dolor agudo, en el que el disolvente utilizado fue una disolución de Ringer. Además, la solicitud describe la capacidad potencial de preparar una composición para su administración, sin dar ningún ejemplo de tales composiciones.

Además, Nakata et al., en *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, vol. 24, núm. 1, págs. 27-31, describen un estudio de las características de un análogo del tetrapéptido H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH en comparación con la morfina.

Sakarada et al. en *Neuropharmacology*, vol. 32, núm. 7, págs. 689-693, describen el efecto antinociceptivo del tetrapéptido H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH.

Mizoguchi et al. en *Peptides*, vol. 27, núm. 11, págs. 2786-2793, describen el efecto antinociceptivo del péptido Tyr-D-Arg-Phe-Sar.

Una cierta desventaja de estos tetrapéptidos fue la presencia de cierta dependencia física y el desarrollo de una tolerancia a ellos [3]. Durante la administración a largo plazo del tetrapéptido Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂, condujo al desarrollo de una tolerancia en ratones al efecto analgésico del péptido [4]. En otro estudio, se demostró que las ratas también desarrollaron dependencia física, pero los signos de adicción fueron significativamente menos pronunciados que en el desarrollo de dependencia física a la morfina [5]. Esto se debe a un mecanismo de acción similar en los tetrapéptidos y las moléculas pequeñas en sustancias similares a la morfina, pero la diferencia significativa en las manifestaciones de los efectos secundarios indica una diferencia en el mecanismo de acción.

La selectividad de los tetrapéptidos señalados hacia los diferentes tipos de receptores opioides, así como las transformaciones bioquímicas cercanas al metabolismo natural internalizado en los receptores celulares, proporciona efectos más leves de tolerancia y dependencia cuando se usan a las dosis terapéuticas.

Una de las características más importantes de las actividades biológicas de los péptidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH es la falta de efectos secundarios graves, como los efectos sobre el sistema nervioso central en forma de alteración de la conciencia y el desarrollo de euforia, así como la falta de efecto sobre el sistema respiratorio. Otra característica positiva de los tetrapéptidos señalados es la amplia gama terapéutica de aplicación sin efectos secundarios significativos. Estas características permiten el uso de medicamentos basados en los tetrapéptidos en un rango terapéutico más amplio, fuera de los hospitales, en el campo o en el hogar, que pueden ser administrados por personal poco cualificado o por los propios pacientes.

Sumario de la invención

A lo largo de este documento, a menos que se indique lo contrario, los términos "que comprende", "que consiste en" y similares, deben interpretarse como no exhaustivos o, en otras palabras, con el significado de "incluido, pero no limitado a".

La presente invención se basa en una sustancia peptídica analgésica de estructura H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y/o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH. Esta composición farmacéutica se puede recomendar para tratar el dolor crónico de pacientes con cáncer en los últimos estadios de la enfermedad y es eficaz para tratar el dolor agudo en condiciones extremas. Esta composición farmacéutica se considera un analgésico altamente eficaz cuando se usa para sistemas terapéuticos

subcutáneos, intravenosos, intradérmicos, intranasales, parches para la piel, supositorios rectales o sistemas terapéuticos transdérmicos para tratar el dolor crónico en pacientes con cáncer en los últimos estadios.

5 El objetivo de la presente invención es el desarrollo de un compuesto, método y medio de uso de un compuesto que comprende como ingrediente activo uno o más tetrapéptidos seleccionados de H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH, que es un agente analgésico altamente activo para inyección, infusión y/o administración nasal para la prevención y/o el tratamiento del dolor agudo y/o crónico y que puede almacenarse durante largos periodos en forma de disolución y emulsión para administración directa, así como en forma de polvo seco, por ejemplo en forma de polvo seco o liofilizado.

El problema se resuelve según la reivindicación 1.

10 La presente invención se refiere a una composición para el uso en la prevención y/o el tratamiento del dolor agudo y/o crónico en un sujeto, que comprende un péptido analgésico que tiene una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH, donde la composición es una forma farmacéutica líquida inyectable y/o una forma nasal, donde las formas farmacéuticas líquidas para inyección comprenden el péptido analgésico en una cantidad del 0,1 al 2 % en masa y un excipiente hasta el 100 % y la forma nasal comprende el péptido analgésico en una cantidad del 0,05 al 2 % en masa y un excipiente hasta el 100 %, y donde las formas farmacéuticas líquidas para inyección y la forma nasal son estables a temperatura ambiente y tienen una vida útil de al menos 2 años, y donde el excipiente comprende un tampón en una cantidad del 0,01-0,2% en masa, donde el tampón comprende acetato de sodio.

20 El excipiente se selecciona además del grupo que consiste en estabilizantes, sustancias de prolongación, aditivos tamponadores, emulsionantes/solubilizantes, disolventes, rellenos, conservantes y otras sustancias auxiliares permitidas para el uso médico. Según una realización no inventiva, la composición contiene la siguiente relación, en porcentaje en masa (% en masa):

Secuencia tetrapeptídica H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y/o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH: 0,01-99,99

Excipientes hasta el 100.

25 El estabilizante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en Trilon B, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, glicina, arginina, histidina, lisina o sus sales fisiológicamente aceptables, tales como clorhidrato, sulfato, acetato, glutamato, aspartato y maleato u otros;

30 La sustancia de prolongación comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en polivinilpirrolidona con un peso molecular de 10 a 60 kDa, dextrano con un peso molecular de 10 a 100, poli(alcohol vinílico), glicerol, carboximetilcelulosa y sus sales;

El aditivo tamponador comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en cloruro de sodio, monohidrógeno y/o dihidrógeno fosfato de sodio/potasio, acetato de amonio;

35 El emulsionante/solubilizante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en lecitina de soja, polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, palmitato de sorbitán, Span 20, Span 40, Span 60, Span 85 y dodecilsulfato de sodio;

El disolvente comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en agua para inyección, solución salina estéril, aceite de oliva, aceite de semilla de melocotón y aceite de girasol;

El relleno comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en sorbitol, manitol, xilitol, lactosa, sacarosa, dextrosa, un copolímero de ácidos láctico y glicólico; y

40 El conservante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en hidrato de clorobutanol, alcohol etílico (etanol), alcohol bencílico, fenol, cresol, metacresol, clorocresol, ácido benzoico, ácido sórbico, mertiolato, nipagina, nipasol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro o bromuro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de lauril dimetil bencil amonio.

45 Los medios de administración propuestos pueden ser en forma de polvo seco, disolución para administración intramuscular o intravenosa, inyección subcutánea o intradérmica o disolución para infusión.

Los medios propuestos para la administración nasal pueden estar en forma de un polvo seco, emulsión, disolución líquida.

El agente propuesto en forma líquida debe tener un pH de 4 a 8. Preferiblemente, 4,5-5,5.

50 La invención consiste en que, tal como se estableció experimentalmente, la adición a la secuencia tetrapeptídica H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y/o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH de uno de los excipientes enumerados anteriormente mejora la biodisponibilidad biológica, reduce el desarrollo de los efectos adversos expresados en los trastornos del sistema

nervioso central e insuficiencia respiratoria, el desarrollo de tolerancia al tratamiento, lo que proporciona un resultado farmacológico más pronunciado.

5 Por tanto, la sustancia desarrollada permite su uso en la terapia médica para el tratamiento o la prevención del dolor agudo o crónico, facilita la administración de la dosis terapéutica requerida y asegura la exactitud de la cantidad requerida para una dosis terapéutica.

Además de las ventajas terapéuticas enumeradas anteriormente, la sustancia propuesta es estable a temperatura ambiente y tiene una vida útil prolongada (al menos 2 años).

10 Se han seleccionado y estudiado experimentalmente formulaciones inyectables y/o de administración nasal para la prevención y/o el tratamiento del dolor agudo y/o crónico de diversos orígenes que contienen los siguientes componentes:

1. Formas farmacéuticas líquidas para inyección:

	Rango, % en masa
Tampón	0,01-0,2
Relleno	0-6
Estabilizante	0-4
Sustancia tetrapeptídica	0,01-5
Disolvente	Hasta 100

El pH está en el rango de 4-8.

Esta forma tiene una vida útil de 2 años a +4-18 °C.

15 2. Forma en polvo (composición disuelta después de la dilución con agua para inyección, hasta 1 ml):

	Rango, mg/ml
Tampón	0,01-0,2
Relleno	0-6
Prolongador	0-8
Estabilizante	0-4
Sustancia tetrapeptídica	0,01-99,99

El pH está en el rango de 4-8 después de la disolución.

Esta forma tiene una vida útil de más de 2 años a +4-18 °C.

3. Para la forma nasal, se utiliza la forma líquida con la adición de conservantes:

	Rango, % en masa
Tampón	0,01-0,2
Relleno	0-1,5

ES 2 930 757 T3

	Rango, % en masa
Estabilizante	0-1,5
Sustancia tetrapeptídica	0,01-5
Conservante	0-0,5
Disolvente	Hasta 100

El pH está en el rango de 4-8.

Las composiciones se pueden aplicar en las siguientes enfermedades, que van acompañadas de dolor, de naturaleza aguda y/o crónica:

- 5
 - Oncología
 - Dolor por cáncer generalmente en estadio 3-4 o en cuidados paliativos
 - Quemaduras de diversos orígenes
 - Dolor traumático y quirúrgico
 - Lesiones, analgésico postoperatorio, uso en medicina de urgencia
- 10
 - Parto
 - Cardiología

Las composiciones se pueden usar en el infarto de miocardio, angina inestable, es decir, estados acompañados de dolor intenso. Debido a que las enfermedades cardiacas se encuentran entre las más comunes, la necesidad de tal terapia analgésica se da con frecuencia.

- 15 En el campo de la ciencia veterinaria, las composiciones pueden usarse en la operación y el uso de analgesia postoperatoria para animales domésticos y de granja, para el tratamiento del dolor en caballos con lesiones, operaciones de esterilización e inseminación artificial, etc.

- 20 En casos especiales, la sustancia se puede utilizar en los siguientes compuestos que se desarrollan experimentalmente. Un medio para la administración mediante inyección y/o la administración nasal para la prevención y/o el tratamiento del dolor agudo y/o crónico de diversos orígenes que contiene los siguientes componentes:

1. Formas farmacéuticas líquidas para inyección:

	Rango, % en masa
Acetato sódico	0,01-0,2
Cloruro sódico	0-1
Manitol	0-6
Glicina	0-4
Sustancia tetrapeptídica	0,1-2
Agua para inyección	Hasta 100

El pH está en el rango de 4-8.

ES 2 930 757 T3

Esta forma tiene una vida útil de más de 2 años a +4-18 °C.

2. Forma de polvo (composición disuelta después de la dilución con agua para inyección, hasta 1 ml):

	Rango mg/ml
Acetato sódico	0,01-0,2
Manitol	0-6
Polivinilpirrolidona de PM medio	0-8
Glicina	0-4
Sustancia tetrapeptídica	0,1-99,99

El pH está en el rango de 4-8 después de la dilución.

5 Esta forma tiene una vida útil de más de 2 años a +4-18 °C.

3. Para la forma nasal, se usa la forma líquida con la adición de conservantes:

	Rango, % en masa
Acetato sódico	0,01-0,2
Cloruro sódico	0-1
Manitol	0-1,5
Glicina	0-1,5
Metacresol	0-0,5
Tetrapéptido	0,05-2
Agua para inyección	Hasta 100

El pH está en el rango de 4-8.

10 También se propone un método de preparación de un medio para inyección y/o administración nasal, basado en la secuencia del tetrapéptido H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y/o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH, para prevenir y/o curar el dolor extremo y/o crónico, mediante la combinación de uno o más tetrapéptidos con la siguiente secuencia: H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH con al menos un excipiente apropiado y, si es necesario, agentes de esterilización; verter la disolución en ampollas, viales o recipientes para disoluciones de infusión; liofilización; cierre de ampollas o taponado de botellas con el producto terminado.

15 También se proporciona un método para prevenir y/o tratar el dolor agudo y/o crónico, que comprende administrar la sustancia mencionada anteriormente mediante inyección y/o administración nasal de la secuencia tetrapeptídica H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y/o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH en una dosis terapéutica.

20 Dependiendo de las características específicas del caso clínico y los parámetros fisiológicos del paciente, la sustancia se administra mediante inyección, preferiblemente por vía subcutánea o intradérmica o intranasal con 0,5-10 mg de tetrapéptido(s). Antes de usar la forma en polvo, se diluye con agua para inyección en una cantidad de 1-2 ml, y preferiblemente en una cantidad de 1,2 ml.

ES 2 930 757 T3

Preferiblemente, el al menos un excipiente adicional se selecciona del grupo que consiste en: estabilizantes, prolongadores, aditivos tamponadores, emulsionantes/solubilizantes, disolventes, rellenos, conservantes y otros excipientes permitidos para el uso médico.

- 5 Preferiblemente, el estabilizante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: Trilon B, metabisulfato de sodio, tiosulfato de sodio, glicina, arginina, histidina, lisina o sus sales fisiológicamente aceptables, tales como clorhidrato, sulfato, acetato, glutamato, aspartato y maleato.

Preferiblemente, el prolongador comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: polivinilpirrolidona con un peso molecular de 10-60 kDa, dextrano con un peso molecular de 10-100 kDa, poli(alcohol vinílico) y carboximetilcelulosa sódica.

- 10 Preferiblemente, el aditivo tamponador comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: cloruro de sodio, monohidrógeno y/o dihidrógeno fosfato de sodio/potasio y acetato de amonio.

Preferiblemente, el emulsionante/solubilizante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: lecitina de soja para inyección, polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, Span 20, Span 40, Span 60, Span 85 y dodecil sulfato sódico.

- 15 Preferiblemente, el disolvente comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: agua para inyección, solución salina estéril, aceite de oliva, aceite de semilla de melocotón y aceite de girasol.

Preferiblemente, el relleno comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: sorbitol, manitol, xilitol, lactosa, sacarosa, dextrosa, un copolímero de ácidos láctico y glicólico.

- 20 Preferiblemente, el conservante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: hidrato de clorobutanol, alcohol etílico (etanol), alcohol bencílico, fenol, cresol, metacresol, clorocresol, ácido benzoico, ácido sórbico, mertiolato, nipagina, nipasol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro o bromuro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de lauril dimetil bencilamonio.

- 25 Preferiblemente, la composición puede tener cualquier forma adecuada para inyección y/o administración enteral: aerosol nasal, gotas nasales, comprimidos sublinguales o bucales, supositorios rectales y sistemas de transporte transdérmico.

Preferiblemente, la composición puede estar en forma de polvo seco, o en forma líquida como disolución para administración intramuscular o intravenosa, disolución para inyección o infusión subcutánea o intradérmica, o disolución para administración nasal.

Preferiblemente, la composición en forma líquida tiene un pH de 4 a 8, preferiblemente 4,5-5,5.

- 30 Preferiblemente, la forma farmacéutica líquida para administración comprende, para inyección, lo siguiente en % en masa:

Tampón	0,01-0,2
Relleno	0-6
Estabilizante	0-4
Sustancia tetrapeptídica	0,01-5
Disolvente	Hasta 100

Preferiblemente, la forma de polvo comprende (composición disuelta después de la dilución con agua para inyección hasta 1 ml, en mg/ml):

Tampón	0,01-0,2
Relleno	0-6
Prolongador	0-8

ES 2 930 757 T3

Estabilizante	0-4
Sustancia tetrapeptídica	0,01-99,99

Preferiblemente, la forma líquida para administración nasal comprende lo siguiente en % en masa:

Tampón	0,01-0,2
Relleno	0-1,5
Estabilizante	0-1,5
Sustancia tetrapeptídica	0,01-5
Conservante	0-0,5
Disolvente	Hasta 100

Preferiblemente, la forma líquida comprende inyectar en % en masa lo siguiente:

- 5 Acetato de sodio 0,04
- Cloruro de sodio 0,5
- Manitol 0,5
- Glicina 0,5
- Tetrapéptido 0,2
- 10 Agua para inyección hasta 100
- pH a 4,7

Preferiblemente, la forma de polvo contiene (composición disuelta después de la dilución con agua para inyección hasta 1 ml, en mg/ml):

- Acetato de sodio 0,4 mg
- 15 Manitol 5 mg
- Glicina 5 mg
- Tetrapéptido 2 mg
- pH a 4,7

Preferiblemente, la forma líquida para administración nasal contiene preferiblemente lo siguiente en % en masa:

- 20 Acetato de sodio 0,04
- Cloruro de sodio 0,5
- Manitol 0,5
- Glicina 0,5
- Tetrapéptido 0,15
- 25 Cresol 0,1
- Agua para inyección hasta 100

pH a 4,7

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica o medicamento que comprende un péptido analgésico que tiene una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH según la reivindicación 1.

5 Preferiblemente, la composición farmacéutica o el medicamento se utilizan en un método de tratamiento médico.

Preferiblemente, el método de tratamiento médico comprende prevenir y/o tratar el dolor agudo y/o crónico en un sujeto.

10 De acuerdo con un aspecto, se proporciona el uso de un péptido analgésico que tiene una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH según cualquiera de los aspectos primero y segundo de la presente invención, en la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar el dolor agudo y/o crónico en un sujeto.

15 De acuerdo con un aspecto, se proporciona un péptido analgésico que tiene una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH según la reivindicación 1, para el uso en un método para prevenir y/o tratar el dolor agudo y/o crónico en un sujeto, y el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido analgésico.

Preferiblemente, el péptido analgésico se administra en una cantidad de 0,01 a 10 mg/dosis, preferiblemente de 0,5 a 10 mg/dosis. También se describe un método no inventivo para prevenir y/o tratar el dolor agudo y/o crónico en un sujeto, que comprende un método para administrar el compuesto o la composición según cualquiera de los aspectos primero y segundo de la presente invención en una cantidad terapéuticamente eficaz.

20 Preferiblemente, el compuesto o la composición se administra en una cantidad de 0,01 a 10 mg/dosis, preferiblemente de 0,5 a 10 mg/dosis.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de preparación de la composición de acuerdo con la presente invención, que comprende mezclar el péptido analgésico con al menos un excipiente adecuado.

25 Preferiblemente, si es necesario un agente esterilizante; el método comprende además verter la mezcla en ampollas, viales o recipientes para disoluciones de infusión; liofilización; cierre de ampollas o taponado de viales o envases con el producto terminado.

30 Preferiblemente, el al menos un excipiente adicional se selecciona del grupo que consiste en: estabilizantes, prolongadores, aditivos tamponadores, emulsionantes/solubilizantes, disolventes, rellenos, conservantes y otros excipientes permitidos para las aplicaciones médicas.

Preferiblemente, si se usa un estabilizante, el estabilizante se selecciona del grupo que consiste en: Trilon B, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, glicina, arginina, histidina, lisina o sus sales fisiológicamente aceptables, tales como clorhidrato, sulfato, acetato, glutamato, aspartato y maleato.

35 Preferiblemente, si se usa un prolongador, el prolongador comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: polivinilpirrolidona con un peso molecular de 10-60 kDa, dextrano con un peso molecular de 10-100 kDa, poli(alcohol vinílico) y carboximetilcelulosa sódica.

Preferiblemente, si se usa un aditivo tamponador, el aditivo tamponador comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: cloruro de sodio, monohidrógeno y/o dihidrógeno fosfato de sodio/potasio, acetato de sodio y acetato de amonio.

40 Preferiblemente, si se utiliza un emulsionante/solubilizante, el emulsionante/solubilizante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: lecitina de soja, polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, palmitato de sorbitán, Span 20, Span 40, Span 60, Span 85 y dodecilsulfato de sodio.

45 Preferiblemente, si se usa un disolvente, el disolvente comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: agua para inyección, solución salina estéril, aceite de oliva, aceite de semilla de melocotón y aceite de girasol.

Preferiblemente, si se usa un relleno, el relleno comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: sorbitol, manitol, xilitol, lactosa, sacarosa, dextrosa, un copolímero de ácidos láctico y glicólico.

50 Preferiblemente, si se usa un conservante, el conservante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: clorobutanol hidratado, alcohol etílico (etanol), alcohol bencílico, fenol, cresol, metacresol, clorocresol, ácido benzoico, ácido sórbico, mertiolato, nipagina, nipasol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro o bromuro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de lauril dimetil bencil amonio.

Preferiblemente, la preparación puede tener cualquier forma adecuada para inyección y/o administración enteral: aerosol nasal, gotas nasales, comprimidos sublinguales o bucales, supositorios rectales y sistemas de transporte transdérmico.

5 Preferiblemente, la preparación puede estar en forma de polvo seco, o en forma líquida como una disolución para administración intramuscular o intravenosa, disolución para inyección o infusión subcutánea o intradérmica, o una disolución para administración nasal.

Preferiblemente, la preparación en forma líquida tiene un pH de 4 a 8, preferiblemente 4,5-5,5.

10 Otros aspectos y ventajas de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la revisión de la siguiente descripción, que prosigue con referencia a los siguientes dibujos ilustrativos de diversas realizaciones de la invención.

Descripción detallada

15 A continuación se describirán realizaciones particulares de la presente invención. La terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Además, a menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

El uso de las formas singulares "un(a)" y "el/la" incluye los referentes tanto singulares como plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

20 El uso de "o", "/" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso de los términos "que incluye" y "que tiene", así como otras formas de esos términos, como "incluye", "incluido", "tiene" y "tienen", no son limitantes.

Los términos "% en masa" y "% en peso" tienen el mismo significado y pueden usarse indistintamente a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 El término "% en masa" o "porcentaje en masa" representa la concentración de un elemento en un compuesto o un componente en una mezcla. El porcentaje en masa se calcula como la masa de un componente dividida por la masa total de la mezcla, multiplicada por 100%. Por ejemplo, una sustancia o componente particular en una mezcla líquida tiene un % en masa de 1. Esto significa que cien microlitros (100 μ l) de la mezcla líquida contienen 1 mg de la sustancia o compuesto. En otras palabras, en un mililitro (1 ml) de la mezcla líquida, la sustancia o compuesto está presente en una cantidad de 10 mg, es decir, 10 mg/ml. Por lo tanto, 1% en masa equivale a 10 mg/ml.

30 El término "excipiente" o "excipientes" puede denominarse respectivamente "sustancia auxiliar" o "sustancias auxiliares".

Para una mejor comprensión de la invención, a continuación se muestran ejemplos de cómo obtener las formas farmacéuticas propuestas, y la posible composición y propiedades de la preparación resultante.

Ejemplo 1

Obtención del péptido

35 Se sintetizaron los péptidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH en un sintetizador de péptidos automatizado Aapptec Focus XC III con un método en fase sólida mediante un protocolo Fmoc sobre un soporte polimérico basado en una matriz de poliestireno Rink usando el método de DEPCDI/HOBt de activación de aminoácidos. Los péptidos se escindieron de la resina y se desbloquearon con una mezcla de TFA:m-cresol. La purificación de la sustancia peptídica se llevó a cabo mediante HPLC de fase inversa (columna Sigma-Aldrich Co. LLC
40 SUPELCO Ascentis C18 HPLC, 10 x 250 mm) con un gradiente de acetonitrilo. La identidad de los péptidos se determinó mediante espectrometría de masas (MALDI). La pureza del producto es del 98% o mejor.

Además, los péptidos se pueden sintetizar mediante el método descrito en las solicitudes JPS58213743 (A) y JPS6054400 (A) o cualquier otro método de síntesis de péptidos en fase líquida o en un medio sólido.

Ejemplo 2

45 Preparación de la formulación que comprende el péptido.

La base para la preparación efectiva, además de la sustancia activa, es la formulación de la dosis requerida. La selección adecuada de los componentes de la dosificación mantiene el efecto biológico de los ingredientes activos del medicamento durante un largo período de tiempo. Para el compuesto de dosificación que proporciona la conservación a largo plazo de las propiedades biológicas del péptido activo, se desarrolló la siguiente composición: disolución de 1
50 ml: 0,4 mg de acetato de sodio, 1,8 mg de cloruro de sodio, 10 mg de manitol, 40 mg de polivinilpirrolidona 40000, 20

ES 2 930 757 T3

mg de glicina, 1,5-3 mg del tetrapéptido, pH = 4,5-5,5 antes de la liofilización. Eso proporciona la conservación a largo plazo de las propiedades biológicas del péptido activo. La preparación se vierte en viales y se liofiliza.

Después de la liofilización y de tapar los viales, se analizó la humedad residual, que estaba en el rango de 3-4,3 % en las condiciones de liofilización seleccionadas.

- 5 La composición de la formulación peptídica conserva su actividad biológica y estabilidad cuando se almacena a temperatura ambiente durante un año o más. Preferiblemente, la composición se almacena en un lugar oscuro a una temperatura de 6-10 °C.

Ejemplo 3

Preparación de un polvo estéril seco para inyección

- 10 Se obtuvieron formas farmacéuticas inyectables estables de los tetrapéptidos con una secuencia de H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH en forma de polvo seco, preparadas asépticamente a partir del tetrapéptido triturado estéril y los excipientes. Como relleno de la composición para la preparación de la forma de polvo seco se pueden usar los mencionados anteriormente, sorbitol, manitol, xilitol, lactosa, sacarosa, dextrosa, un copolímero de los ácidos D,L-láctico y glicólico; para las aplicaciones médicas se permiten las sustancias que tienen un efecto estabilizante sobre la molécula tetrapeptídica (glicina, arginina, histidina, lisina o sus sales fisiológicamente aceptables)
- 15 y otras adiciones.

La composición farmacéutica específica se produjo en forma sólida estéril como un polvo seco. El fármaco, en apariencia, es un polvo amorfo o una masa porosa de color blanco a blanco amarillento o amarillo, en una ampolla o un vial.

- 20 El vial o la ampolla contiene la siguiente composición después de la dilución con agua para inyección hasta 1 ml (mg/ml):

Acetato de sodio 0,4 mg

Manitol 5 mg

Glicina 5 mg

- 25 Tetrapéptido 1,5 mg

pH a 4,7

Como se indicó anteriormente, al usar ampollas o viales el contenido se disolvió en 1,2 ml de agua para inyección.

Esta forma tiene una vida útil de más de 2 años a +4-18 °C.

Ejemplo 4

- 30 Preparación de un polvo estéril seco para inyección de acuerdo con otra realización.

Se preparan formas farmacéuticas inyectables estables de los tetrapéptidos con una secuencia de H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH en forma de polvo seco como se describió en el Ejemplo 3 anterior. En esta realización particular, el vial o la ampolla contiene la siguiente composición previa tras la dilución con agua para inyección hasta 1 ml (mg/ml):

- 35 Acetato de sodio 0,4 mg

Manitol 5 mg

Glicina 5 mg

Tetrapéptido 2 mg

pH a 4,7

- 40 Como se indicó anteriormente, al usar ampollas o viales, el contenido se disolvió en 1,2 ml de agua para inyección.

Esta forma tiene una vida útil de más de 2 años a +4-18 °C.

Ejemplo 5

Preparación de una disolución inyectable acuosa

5 Para preparar una disolución inyectable estable en agua para inyección primero se disuelven los excipientes de grupos de prolongación/prolongadores, estabilizantes, etc. Para la prolongación durante la etapa de composición en una disolución acuosa para inyección se puede utilizar polivinilpirrolidona, con un peso molecular de 10-60 kDa, dextrano con una masa molecular de 10-100 kDa, glicerol, poli(alcohol vinílico), carboximetilcelulosa de sodio. Como estabilizantes en la composición se pueden usar Trilon B, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, glicina, arginina, histidina, lisina o sus sales fisiológicamente aceptables (clorhidrato, sulfato, acetato, glutamato, aspartato y maleato) para la disolución inyectable acuosa. Luego, en la disolución resultante de excipientes, se disuelve la sustancia tetrapeptídica. La disolución resultante se esterilizó mediante filtración con una membrana en condiciones asépticas, pasando a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,22 µm, se vertió en ampollas o viales en una atmósfera de gas inerte, luego se envasó en un vial o ampolla y se convirtió en el producto terminado.

10 La composición farmacéutica específica se prepara en forma líquida y, en apariencia, es un líquido transparente sellado en viales o ampollas. Una ampolla/vial contiene un tetrapéptido H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH.

El vial o ampolla contiene la siguiente composición en % en masa:

- 15 Acetato de sodio 0,04
 Cloruro de sodio 0,5
 Manitol 0,5
 Glicina 0,5
 Tetrapéptido 0,15
 20 Agua para inyección hasta 100
 pH a 4,7

La preparación obtenida está lista para la inyección inmediata.

Esta forma tiene una vida útil de 2 años a +4-18 °C.

Ejemplo 6

25 Preparación de una disolución inyectable acuosa de acuerdo con otra realización.

Se prepara una disolución inyectable estable en agua para inyección como se describió en el Ejemplo 5 anterior. En esta realización particular, el vial o la ampolla contiene la siguiente composición en % en masa:

- 30 Acetato de sodio 0,04
 Cloruro de sodio 0,5
 Manitol 0,5
 Glicina 0,5
 Tetrapéptido 0,2
 Agua para inyección hasta 100
 pH a 4,7

35 La preparación obtenida está lista para la inyección inmediata.

Esta forma tiene una vida útil de 2 años a +4-18 °C.

Ejemplo 7

Preparación de una disolución para administración nasal

40 Para preparar una disolución inyectable estable en agua, primero se disuelven los excipientes de grupos de prolongación, estabilizantes, etc. Debido a que la composición de prolongación es una disolución acuosa para inyección, se puede utilizar polivinilpirrolidona, con un peso molecular de 10-60 kDa, dextrano con una masa molecular de 10-100 kDa, glicerol, poli(alcohol vinílico), carboximetilcelulosa de sodio. Como estabilizantes se pueden usar en la composición Trilon B, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, glicina, arginina, histidina, lisina o sus sales fisiológicamente aceptables (clorhidrato, sulfato, acetato, glutamato, aspartato y maleato) para la disolución inyectable acuosa. Puede incluirse uno de los conservantes anteriores para aumentar la estabilidad de la composición

45

antimicrobiana del fármaco. Luego, en la disolución resultante de excipientes, se disuelve la sustancia tetrapeptídica. La disolución resultante se esterilizó mediante filtración en membrana en condiciones asépticas, haciéndola pasar a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,22 μm , se vertió en un recipiente de vidrio o polímero en una atmósfera de gas inerte. Luego se cierran las botellas para recibir el producto terminado.

- 5 La composición farmacéutica específica se prepara en forma líquida y, en apariencia, es un líquido transparente sellado en viales con una boquilla de goteo o pulverización.

El vial o ampolla contiene la siguiente composición en % en masa:

- Acetato de sodio 0,04
- Cloruro de sodio 0,5
- 10 Manitol 0,5
- Glicina 0,5
- Tetrapéptido 0,15
- Cresol 0,1
- Agua para inyección hasta 100
- 15 pH a 4,7

Esta forma tiene una vida útil de 1 año a +4-8 °C.

Ejemplo 8

Preparación de un polvo liofilizado para inyección

- 20 Para producir un polvo liofilizado soluble y estable, con una vida útil prolongada, se utilizan excipientes de los grupos de rellenos, estabilizantes, aditivos tamponadores y prolongadores para producir una disolución adecuada para inyección.

Las composiciones farmacéuticas basadas en los tetrapéptidos pueden prepararse mediante cualquier método de liofilización conocido. Uno de estos métodos comprende las siguientes etapas:

1. Preparación de la disolución de relleno.
 - 25 - Disolución del tetrapéptido indicado en agua para inyección.
 - Adición de sustancias auxiliares.
2. Filtración esterilizante, que incluye una filtración preliminar y filtros esterilizantes en serie con un diámetro de poro de 0,5 y 0,22 μm .
3. Rellenado aséptico de viales o ampollas con la disolución.
- 30 4. Liofilización de la disolución en una instalación de liofilización. Los casetes se colocan en un dispositivo de liofilización donde se encuentra la disolución y se congela durante un período de 4 horas a una temperatura de -45 °C. El secado se realiza a una presión residual de 100 a 120 micrómetros de Hg durante 48 horas.
5. Sellado de las ampollas, taponado y engarzado de los viales para elaborar el producto terminado.
6. Embalaje y etiquetado.

- 35 La composición farmacéutica se prepara en forma de un sólido estéril y en apariencia es un polvo amorfo o un comprimido friable en una ampolla o vial.

El vial o ampolla contiene la siguiente composición, a 1 ml después de la dilución con agua para inyección (en mg/ml):

- Acetato de sodio 0,4 mg
- Manitol 5 mg
- 40 Glicina 5 mg
- Tetrapéptido 1,5 mg

pH a 4,7

Como se indicó anteriormente, al usar ampollas o viales, el contenido se disolvió en 1,2 ml de agua para inyección.

Ejemplo 9

Preparación de un polvo liofilizado para inyección de acuerdo con otra realización

- 5 Se prepara un polvo liofilizado soluble estable para inyección como se describió en el Ejemplo 8 anterior. En esta realización particular, el vial o la ampolla contiene la siguiente composición, a 1 ml tras la dilución con agua para inyección (en mg/ml):

Acetato de sodio 0,4 mg

Manitol 5 mg

- 10 Glicina 5 mg

Tetrapéptido 2 mg

pH a 4,7

Como se indicó anteriormente, al usar ampollas o viales, el contenido se disolvió en 1,2 ml de agua para inyección.

Ejemplo 10

- 15 Preparación de una formulación de tetrapéptido para cartuchos de plumas de inyección y jeringas precargadas y pruebas de almacenamiento acelerado.

La forma farmacéutica se destina a jeringas precargadas o cartuchos de plumas de inyección. En este caso, se inyectan al paciente por vía subcutánea pequeñas cantidades de la formulación varias veces al día.

- 20 Esta forma farmacéutica requiere el uso de una formulación concentrada de tetrapéptido para la administración repetida al paciente con un inyector de tipo pluma. Para que el paciente reciba la cantidad requerida del medicamento, su concentración debe ser significativamente mayor que con una inyección convencional con una jeringa. La dosis máxima potencial para una sola administración a un paciente puede ser de hasta 10 mg de péptido. Por tanto, una pluma de inyección que sea capaz de administrar un fármaco de 0,1-0,3 ml debe tener un cartucho con una concentración de tetrapéptido de hasta 50 mg/ml.

- 25 En este ejemplo se decidió realizar preparaciones de formulación peptídica para cartuchos con una concentración de tetrapéptido de 5, 10, 30 y 50 mg/ml.

Las composiciones farmacéuticas específicas se fabrican en forma líquida y, en apariencia, son un líquido transparente envasado en cartuchos o jeringas. Una unidad de fármaco contiene un tetrapéptido H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH

- 30 El cartucho contiene la siguiente composición en % en masa:

Acetato de sodio 0,04

Cloruro de sodio 0,2

Manitol 0,2

Metacresol 0,2

- 35 Glicina 0,2

Tetrapéptido 0,5, 1, 3 o 5

Agua para inyección hasta 100

pH a 5,2

- 40 La disolución resultante se esterilizó mediante filtración por membrana en condiciones asépticas, haciéndola pasar a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,22 µm, se vertió en cartuchos o jeringas en una atmósfera de gas inerte y se convirtió en los productos terminados.

Se probó la estabilidad de las formas farmacéuticas mediante el método de almacenamiento acelerado a una temperatura de 25 °C de acuerdo con los métodos aprobados (Directrices armonizadas ICH para pruebas de estabilidad de nuevos fármacos y productos Q1A(R2)).

Tabla 1: Estabilidad de las formulaciones de tetrapéptidos en pruebas de almacenamiento acelerado a 25 °C

Tiempo de almacenamiento	Concentración del tetrapéptido, mg/ml			
En la producción	4,96	9,92	30,01	50,21
3 meses	4,92	9,9	29,86	49,83
6 meses	4,92	9,76	29,65	49,39
% de pérdida a los 6 meses	98,0	97,3	98,5	98,0

Las condiciones de almacenamiento actuales permiten extrapolar la estabilidad de la formulación durante el almacenamiento durante 2 años a una temperatura de 8-10 °C. La pérdida de sustancia activa en las muestras experimentales fue de alrededor del 2%. Los datos obtenidos mostraron que las formas farmacéuticas probadas tienen una buena estabilidad suficiente para una preparación farmacéutica.

Ejemplo 11

El efecto de la sustancia desarrollada sobre la actividad opioide periférica basado en el ejemplo de los tetrapéptidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ y H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH *in vitro*.

El efecto se evaluó por la capacidad de inhibir la contracción provocada por la estimulación eléctrica de órganos aislados (íleon de conejillo de Indias (ICI)). Se trabajó en un aparato especial para probar sustancias en función de su actividad opioide en el modelo de íleon de conejillo de Indias. Los ICI, obtenidos de animales no lineales, se colocaron en un matraz volumétrico de 10 ml con electrodos insertados que contenían disolución de Krebs a 34 °C en un baño de agua (HOECHST Organbad, Alemania) con un termostato para mantener una temperatura constante en la celda de trabajo. El extremo inferior del ICI se fija al recipiente en la parte inferior. El extremo superior de la ligadura se unió al dispositivo de registro de fuerza del sensor (registro isométrico de sensores K-30, Hugo Sachs Elektronik KG, Alemania). La tensión inicial de los órganos fue de 1 gramo. La disolución con el ICI se aireaba constantemente. Los segmentos de ICI se equilibraron en la disolución de Krebs durante una hora.

Las contracciones del ICI se estimularon mediante electrodos de placa con impulsos eléctricos en una serie de cuatro pulsos rectangulares cada uno con una duración de 0,5 ms y con intervalos de 1,5 ms, con retrasos de 7,5 s entre las series y una tensión de 80 V utilizando un generador de impulsos eléctricos (tipo 215/1, Hugo Sachs Elektronik, Alemania). El registro se realizó en modo de contracción isométrica utilizando sensores K30 a través de amplificadores de dos canales MS 6601 (Watanabe, Japón).

Al inicio se aplicó la estimulación durante un mínimo de 45 minutos, lo que permitió establecer respuestas reproducibles.

La sustancia ensayada se administró en una disolución que bañaba los órganos en un volumen de 0,005 a 0,015 ml, a concentraciones finales de 1×10^{-9} - 1×10^{-6} M. Cada introducción posterior de la sustancia se realizó 1 minuto después de la dosis anterior sin lavar los órganos, de forma acumulativa. Basándose en estos datos, se construyeron gráficos de dosis-respuesta para la morfina y el agente probado. Las sustancias activas se expresaron en un indicador pD2 (numéricamente igual al logaritmo decimal negativo de la concentración de una sustancia que provoca el 50% del efecto máximo). En otras palabras, la potencia de los agonistas de los receptores opioides en ausencia y presencia del antagonista se evaluó como el logaritmo negativo de la concentración requerida para causar el 50 % de la respuesta máxima (pD2) utilizando la ecuación logística descrita por DeLean A. et al. [6].

En particular, se evaluaron las características de la actividad del péptido opioide en comparación con una disolución patrón de morfina. Durante el experimento, se tuvo en cuenta el cambio en las contracciones de amplitud del ICI y se ajustó. Se utilizó una monitorización en paralelo en 4 cámaras con segmentos de ICI para cada sustancia.

El efecto inhibitorio de la morfina y la sustancia tetrapeptídica causado por la estimulación eléctrica se evitó mediante la adición de la disolución de lavado de naloxona, antagonista del receptor opioide, a una concentración de 10^{-6} M.

Según los datos de la Tabla 2, la CE₅₀ para la morfina fue de $3,26 \times 10^{-7}$ M, y el indicador pD2 de 6,48. Para la sustancia tetrapeptídica, la CE₅₀ fue $2,37 \times 10^{-7}$ M, y un pD2 de 6,62. Por lo tanto, la actividad de la sustancia tetrapeptídica fue mayor que la de la morfina, superándola en eficacia y actividad, cuando el fármaco se aplicó a los receptores μ opioides ubicados en el ICI.

Tabla 2: La dependencia del grado de inhibición de la amplitud de movimientos del ICI en función de la concentración de H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ (TP1), H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH (TP2) o morfina.

ES 2 930 757 T3

	Péptido TP1		Péptido TP2		Morfina	
Concentración, M	Amplitud, mm	Efecto inhibitorio, %	Amplitud, mm	Efecto inhibitorio, %	Amplitud, mm	Efecto inhibitorio, %
0,0E+00	38,7	0,0	38,2	0,0	39,5	0,0
1,0E-09	38,7	0,0	38,2	0,0	39,5	0,0
4,0E-09	38,7	0,0	38,2	0,0	39,5	0,0
1,4E-08	36,0	7,0	35,3	7,6	36,0	8,7
4,4E-08	30,3	22,9	29,7	22,2	29,0	25,8
1,4E-07	23,0	41,1	22,0	42,4	23,8	39,2
4,4E-07	15,7	61,1	15,2	60,2	18,0	55,0
1,4E-06	9,3	76,6	8,6	77,5	13,0	68,2

El efecto inhibitorio de la morfina y la sustancia tetrapeptídica sobre las contracciones del ICI causadas por la estimulación eléctrica se neutralizó con éxito agregando a la disolución de lavado un antagonista de los receptores opioides, naloxona, a concentraciones de 10^{-6} M.

5 Ejemplo 12

El estudio del efecto analgésico dependiente de la dosis del compuesto peptídico (en forma de inyección como en el Ejemplo 5 o 6 basado en el tetrapéptido H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂) en la prueba de "retirada de la cola" en ratones.

Esta etapa consistió en seleccionar las dosis eficaces del compuesto peptídico en el test de retirada de la cola en ratones tras una única administración subcutánea de la sustancia a dosis de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 0,7, 1 y 5 mg/kg. El método de la retirada de la cola se basa en un reflejo de flexión espinal en respuesta a un efecto progresivamente creciente de la radiación térmica en la superficie de la piel. Se aplicó un estímulo doloroso en la cola localmente, por acción de radiación térmica, utilizando un analgesiómetro TSE Systems (Alemania). Se ajustó la intensidad del estímulo, correspondiente a un aumento de la temperatura de 30 °C a 60 °C durante 13 segundos. La latencia de la retirada de la cola (RC) de 13 segundos se usó como el tiempo de estimulación máximo permitido. A los ratones de los grupos de prueba se les administró el compuesto peptídico y a los ratones del grupo de control se les administró el disolvente (agua para inyección) por vía subcutánea. La latencia de la retirada de la cola se evaluó 40 minutos después de la administración de la sustancia de estudio o el disolvente. El análisis de los resultados experimentales implicó calcular el efecto máximo posible (EMP).

Tabla 3: Efecto del compuesto peptídico administrado mediante inyección subcutánea sobre la latencia de la retirada de la cola en ratones.

Grupo	RC, s (Media±EEM)	Proporción del efecto máximo posible (EMP), %
Control	4,25±0,54	-
Compuesto peptídico 0,01 mg/kg	5,89±0,19	18,7
Compuesto peptídico 0,05 mg/kg	7,97±0,78	42,5
Compuesto peptídico 0,1 mg/kg	8,36±0,68	47,0

Grupo	RC, s (Media±EEM)	Proporción del efecto máximo posible (EMP), %
Compuesto peptídico 0,5 mg/kg	9,12±0,92	55,7
Compuesto peptídico 0,7 mg/kg	10,15±0,74	57,5
Compuesto peptídico 1 mg/kg	12,53±0,24	94,6
Compuesto peptídico 5 mg/kg	13,00±0	100

Según los datos publicados, la morfina tiene una actividad antinociceptiva en ratones del 50 % del EMP a dosis de 7 mg/kg, del 75 % del EMP a dosis de 10 mg/kg y del 95 % del EMP a dosis de 20 mg/kg [7].

- 5 Durante este estudio, se muestra que a la dosis de 0,1 mg/kg del compuesto peptídico tuvo una actividad cercana a la de 4 mg/kg de la morfina, a la dosis de 0,5 mg/kg tuvo una actividad cercana a la de la morfina a la dosis de 7-8 mg/kg, y el efecto de analgesia total se observó a dosis de 1 mg/kg. El trabajo realizado confirmó el nivel significativamente más alto de actividad del compuesto peptídico en comparación con la morfina en aproximadamente 10-15 veces.

Ejemplo 13

- 10 El estudio del efecto analgésico dependiente de la dosis del compuesto peptídico (en forma de inyección como en el Ejemplo 5 o 6 basado en el tetrapéptido H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂) en la prueba de "placa caliente" en ratas.

- 15 La prueba de la "placa caliente" se basa en el reflejo de la rata que se lame las patas cuando el animal entra en contacto con una superficie caliente. El dispositivo es una superficie metálica con un diámetro de 30 cm cuya temperatura se controla mediante un programa informático. El sitio está cerrado por una cerca transparente con una altura de 40 cm. La temperatura de la almohadilla metálica se fijó exactamente a 52 °C. Al colocar al animal en la superficie, se mide el tiempo hasta el momento en que el animal se lame la pata. Cuando se administran analgésicos, aumenta el tiempo antes de que la rata se lama las patas. La latencia de lamido (HPL) de 40 segundos se usó como el tiempo de estimulación máximo permitido. El estudio se realizó con ratas macho con un peso de 160-180 g, 6 animales por dosis.

- 20 Tabla 4: Efecto del compuesto peptídico administrado mediante inyección subcutánea en la prueba de placa caliente en ratas.

Grupo	HPL, s (Media±EEM)	Proporción del efecto máximo posible (EMP), %
Agua	17,35±4,97	-
Compuesto peptídico 0,1 mg/kg	26,01±8,8	38,2
Compuesto peptídico 5 mg/kg	39,33±1,63	98,3
Morfina 5 mg/kg	27,45±4,4	68,6
Morfina 15 mg/kg	38,31±2,63	95,7

- 25 Los estudios han demostrado la presencia de una alta actividad analgésica de la sustancia inventiva, en comparación con los animales de control que recibieron placebo o morfina. El efecto de analgesia total se observó con una dosis analgésica de péptido de 5 mg/kg. La eficacia analgésica del fármaco propuesto a una dosis de 0,1 mg/kg corresponde

a la de 5 mg/kg de morfina. El trabajo realizado confirmó los datos de un nivel significativamente más alto de actividad del compuesto peptídico en comparación con la morfina, de aproximadamente 10 veces.

Ejemplo 14

5 Evaluación del efecto analgésico del compuesto peptídico en la prueba de contorsiones inducidas por ácido acético en ratones.

Se evaluó el efecto analgésico del compuesto peptídico a las tres dosis (0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg y 1 mg/kg) en la prueba de contorsiones inducidas por ácido acético, una prueba de dolor visceral en ratones, respecto de la morfina. La prueba de contorsiones inducidas por ácido acético es un modelo de un estímulo nociceptivo químico aplicado mediante la inyección intraperitoneal de una disolución de ácido acético. La inyección intraperitoneal de sustancias que irritan las membranas serosas en ratones induce movimientos distintivos, incluidas contracciones de los músculos abdominales seguidas de relajación muscular, extensión de las patas traseras y curvatura de la espalda, lo que se conoce como contorsión. A los ratones se les administró una inyección intraperitoneal de ácido acético al 1% a una dosis de 0,1 ml por 10 g de peso corporal. Después de la inyección, los ratones se colocaron en cámaras acrílicas transparentes y se contó el número de contorsiones en cada animal durante los siguientes 15 minutos. El efecto analgésico se evaluó mediante una reducción del número de contorsiones en los ratones que recibieron el fármaco de estudio respecto del grupo de control. El compuesto peptídico a dosis de 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg y 1 mg/kg, el fármaco comparativo de morfina a dosis de 1 mg/kg y 3 mg/kg y el vehículo (suministrado al grupo de control) se administraron por vía subcutánea 40 minutos antes de la administración intraperitoneal de la disolución de ácido acético. Se utilizó la latencia de inicio de las contorsiones en los ratones como parámetro adicional para evaluar la eficacia de la sustancia en la prueba de contorsiones inducidas por ácido acético. Para los animales que no mostraron ninguna reacción dolorosa (contorsiones) durante el período de observación (15 min), se supuso que la latencia de inicio de las contorsiones fue de 900 segundos (15 min).

El compuesto peptídico exhibió una actividad analgésica dependiente de la dosis. A 0,25 mg/kg, el fármaco redujo significativamente el dolor visceral en un factor de 2,2 respecto del grupo de control; a 0,5 mg/kg y 1 mg/kg la reducción fue en un factor de 31,8 y 74,2 respectivamente ($p < 0,01$). El efecto pronunciado del compuesto peptídico administrado a los ratones a dosis de 0,5 mg/kg y 1 mg/kg se debe al hecho de que la respuesta al dolor (contorsiones) no se observó en todos los animales de estos grupos. Específicamente, el 100 % de los animales mostraron contorsiones en el grupo que recibió el compuesto peptídico por vía subcutánea a 0,25 mg/kg, al igual que en el grupo de control; por el contrario, a 0,5 mg/kg y 1 mg/kg del fármaco de prueba, la respuesta al dolor se observó en el 40,0 % (4 de 10 animales del grupo) y el 55,6 % (5 de 9 animales del grupo) respectivamente (Tabla 3).

Se demostró que el compuesto peptídico aumenta la latencia de inicio de las contorsiones en los ratones de manera dependiente de la dosis. Mientras que a 0,25 mg/kg la latencia de aparición de las contorsiones aumentó significativamente en un factor de 2,6 respecto del grupo de control, la administración a dosis de 0,5 mg/kg y 1 mg/kg produjo un aumento de la latencia de aparición de las contorsiones en un factor de 4,1 y 4,9, respectivamente (Tabla 3).

La actividad analgésica del compuesto peptídico a 0,5 mg/kg y 1 mg/kg fue comparable a la de la morfina, el fármaco comparativo, a 3 mg/kg. El fármaco comparativo a 3 mg/kg redujo significativamente el número de contorsiones en un factor de 42,4 respecto del grupo de control. La ausencia de respuesta al dolor (contorsiones) se produjo en el 37,5 % (3/8) de los ratones de este grupo.

40 Tabla 5: Efecto del compuesto peptídico y la morfina administrados mediante inyección subcutánea sobre el grado de respuesta al dolor en la prueba de contorsiones inducidas por ácido acético en ratones.

Grupo	Número de contorsiones, n (Media±EEM)	Número de ratones sin contorsiones/número de ratones en el grupo (% de ratones sin contorsiones)	Latencia de inicio de las contorsiones, s (Media±EEM)
Control	89,0±2,27	0/7 (0%)	154,3±13,33
Morfina, 1 mg/kg	12,4±3,73	1/7 (14,3%)	467,1±74,41
Morfina, 3 mg/kg	2,1±0,83	3/8 (37,5%)	695,0±85,00
Compuesto peptídico 0,25 mg/kg	40,7±4,50	0/9 (0%)	397,2±69,95

Grupo	Número de contorsiones, n (Media±EEM)	Número de ratones sin contorsiones/número de ratones en el grupo (% de ratones sin contorsiones)	Latencia de inicio de las contorsiones, s (Media±EEM)
Compuesto peptídico 0,5 mg/kg	2,8±1,00	4/10 (40,0%)	632,5±80,62
Compuesto peptídico 1 mg/kg	1,2±0,49	5/9 (55,6%)#	762,8±55,76

5 Por lo tanto, los resultados de la prueba para evaluar el efecto del compuesto peptídico sobre el grado de dolor visceral (prueba de contorsión inducida por ácido acético) confirmaron la actividad analgésica dependiente de la dosis del fármaco a 1 mg/kg y 0,5 mg/kg, que fue comparable al efecto de la morfina a 3 mg/kg y superó el efecto de la morfina a 1 mg/kg.

Ejemplo 15

Duración del efecto analgésico del compuesto peptídico.

La duración del efecto analgésico del compuesto peptídico se evaluó en la prueba de retirada de la cola en ratones como se describió anteriormente.

10 El compuesto peptídico se administró a ratones por vía subcutánea a dosis de 0,5 mg/kg, 1,5 mg/kg y 4,5 mg/kg. El grupo de control de animales recibió una inyección subcutánea del vehículo (agua para inyección). La prueba de RC se evaluó en los ratones que recibieron el compuesto peptídico a los 30 minutos y a las 1, 2, 4, 6 y 8 horas después de la administración.

15 Tabla 6: Evaluación de la duración del efecto analgésico del compuesto peptídico en la prueba de retirada de la cola, EMP, % (Media ± EEM).

Grupo	Nivel de RC tras un tiempo desde la inyección subcutánea, horas					
	0,5	1	2	4	6	8
Compuesto peptídico 0,5 mg/kg	45,6±13,31	49,9±11,54	15,5±4,78	6,3±2,43	6,3±2,94	-2,6±3,18
Compuesto peptídico 1,5 mg/kg	97,2±2,78	62,7±14,4	33,4±4,85	25,6±11,69	4,6±7,8	5,3±3,46
Compuesto peptídico 4,5 mg/kg	100,0±0,00	100,0±0,00	100,0±0,00	49,9±10,21	6,5±5,94	2,6±4,0

Según los datos publicados, la morfina en ratones tiene una duración del efecto analgésico a dosis de 10 mg/kg de alrededor de 2 a 3 horas [7].

20 Por lo tanto, los resultados de las pruebas demuestran que un aumento de la dosis del compuesto peptídico de 0,5 mg/kg a 1,5 mg/kg y 4,5 mg/kg está asociado a un aumento del grado y la duración de su efecto analgésico. La duración máxima del efecto analgésico se evaluó a las 4 horas y se logró tras la dosificación de 1,5 mg/kg y 4,5 mg/kg de la sustancia, y este efecto es más prolongado que en el caso de la morfina.

Ejemplo 16

Evaluación de la tolerancia antinociceptiva del compuesto peptídico y el síndrome de abstinencia en ratones.

25 La prueba de retirada de la cola fue el método principal para evaluar la tolerancia antinociceptiva del compuesto peptídico y el síndrome de abstinencia. La prueba consistió en evaluar la latencia de retirada de la cola (prueba de RC). Se evaluó la latencia basal de la retirada de la cola RCbase antes de administrar las sustancias. La prueba se realizó en ratones macho exogámicos.

30 Los animales se aleatorizaron en 4 grupos de 10 animales en cada grupo: Grupo 1: control; a los animales se les administraron inyecciones subcutáneas de agua para inyección durante 14 días; Grupo 2: grupo de administración de compuesto peptídico único; a los animales se les administró agua para inyección durante 13 días y compuesto

peptídico a una dosis de 0,5 mg/kg el día 14 mediante inyección subcutánea; Grupo 3: grupo de administración crónica del compuesto peptídico; a los animales se les administró el compuesto peptídico a una dosis de 0,5 mg/kg mediante inyección subcutánea durante 14 días; Grupo 4: grupo de abstinencia; a los animales se les administró el compuesto peptídico a una dosis de 0,5 mg/kg mediante inyección subcutánea durante 14 días, la prueba de abstinencia se evaluó después de 48 horas.

La última inyección de fármaco/agua a los grupos 1-3 se administró 40 minutos antes de la prueba.

Tabla 7: Efecto del compuesto peptídico sobre la respuesta al dolor en la prueba de retirada de la cola en ratones (Media ± EEM)

Grupo	RC, s		EMP, %
	Valores iniciales	Tras la administración	
1. Control, agua para inyección	4,4±0,26	4,7±0,56	3,9±4,49
2. Compuesto peptídico 0,5 mg/kg, dosis única	4,5±0,36	8,0±1,03*	43,3±11,19*
3. Compuesto peptídico 0,5 mg/kg, administración crónica	4,6±0,26	8,6±1,25#	50,5±13,92*
4. Compuesto peptídico 0,5 mg/kg, abstinencia	4,7±0,24	4,8±0,36	1,3±3,72

No se observó actividad analgésica ni aumento de la sensibilidad al dolor en el grupo de ratones analizados después de 48 horas de suspensión del compuesto peptídico después de 13 días de inyecciones diarias: la RC antes del tratamiento con el compuesto peptídico y después de la suspensión del fármaco no difirieron (Tabla 6).

Por lo tanto, este estudio indica un efecto antinociceptivo pronunciado del compuesto tetrapeptídico a 0,5 mg/kg (por vía subcutánea) después de una dosis única o un tratamiento crónico, y sugiere la ausencia de tolerancia o síndrome de abstinencia.

Ejemplo 17

Evaluación de la influencia del compuesto peptídico en el comportamiento de los ratones.

El ensayo de la influencia de la sustancia inyectable basada en el tetrapéptido (como en el Ejemplo 2) H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ en el comportamiento de los animales se proporcionó en el estudio de la toxicidad de las dosis altas de la prueba de "campo abierto" y manteniendo el equilibrio sobre una varilla horizontal.

El objetivo del experimento fue identificar una dosis eficaz de la sustancia que afecta al comportamiento de los animales. Se probó en varios animales después de la administración de diferentes dosis del compuesto peptídico.

Estudio de la dosificación y la forma de administración:

1. control sin inyección
2. inyección de 300 µl de disolución salina (control de estrés)
3. sustancia a 0,5 mg/kg (efecto analgésico de la CE₅₀)
4. sustancia a 1,5 mg/kg
5. sustancia a 5 mg/kg
6. sustancia a 10 mg/kg (20 dosis de efecto analgésico de la CE₅₀)
7. sustancia a 20 mg/kg (40 dosis de efecto analgésico de la CE₅₀)
8. sustancia a 100 mg/kg (200 dosis de efecto analgésico de la CE₅₀)
9. morfina a 120 mg/kg (20 dosis de efecto analgésico de la CE₅₀).

Los grupos experimentales y de control de ratones macho se tomaron del mismo lote, aproximadamente del mismo peso (22-24 g).

5 La sustancia se inyectó por vía intraperitoneal en cantidades en peso idénticas a los animales de laboratorio de los grupos experimentales y de control, respectivamente. La sustancia se disolvió en agua para inyección, de modo que el volumen total de la disolución inyectada no excediera de 0,5 ml. La medición se inició 15 minutos después de la inyección.

Se organizaron varios grupos: sin la introducción de la sustancia, y con la introducción de una disolución de morfina o péptido. Después de 15 minutos tras la inyección, se realizó la medición en el siguiente orden:

Prueba de "campo abierto"

10 Cada animal probado se introdujo en una arena redonda, no muy iluminada. La superficie está dividida en bloques cuadrados de 10 cm cada uno. Se cuenta la actividad locomotora del ratón al cruzar los cuadrados. Se registra por separado el movimiento del ratón en el centro de la arena y en la periferia. Se registra la cantidad de veces que el ratón se levanta sobre sus patas traseras "en posición erguida" y la cantidad de veces que el ratón mira dentro de una "madriguera", es decir, los agujeros del suelo. Las observaciones se realizaron visualmente y se introdujeron
15 simultáneamente en una computadora usando un teclado (registro semiautomático).

Equilibrio en una prueba de barra horizontal

Los animales se colocaron sobre una barra de madera de 2 cm de diámetro y 40 cm de largo, a una altura no menor de 60 cm. Luego se registró la duración del mantenimiento del equilibrio en la barra. Se procesaron los resultados utilizando el análisis de dispersión monofactorial ANOVA.

20 Los estudios han demostrado que las dosis altas no conducen a una pérdida significativa de orientación de los animales ni reducen su actividad conductual. Incluso a una dosis de 100 mg/kg, el ratón siguió moviéndose activamente por el campo, aunque con una actividad ligeramente reducida (en un 20-25 % a una dosis de 20-100 mg/kg). Se observó una reducción del 20-30 % en la actividad exploratoria (la medida de la exploración "en posición erguida-de madrigueras").

25 Los experimentos demostraron que no se alcanzó una dosis que causara efectos tóxicos. Incluso a una dosis de 100 mg/kg, los animales continuaron moviéndose activamente, la respiración no se inhibió y los latidos del corazón se mantuvieron estables.

Cabe señalar que con la administración de la sustancia de control de morfina (20 dosis de la CE₅₀), la actividad física se reduce significativamente en un 50-70%.

30 No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales y control en la prueba de mantenimiento del equilibrio sobre una barra horizontal. Los animales experimentales se equilibraron bien sobre el eje. Debe observarse alguna diferencia en el grupo experimental respecto de los animales de control. Se observó la reducción de la actividad en el movimiento horizontal en la barra (10-20%) después de la administración de las dosis más altas de 20-100 mg/kg.

35 Se llegó a la conclusión de que la sustancia a la dosis propuesta no afecta significativamente a las características de comportamiento de los animales. El uso de la sustancia a dosis de hasta 200 CE₅₀ no produce efectos tóxicos.

Las observaciones demuestran que el tetrapéptido H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ posee efectos analgésicos significativamente superiores en comparación con la morfina. Al mismo tiempo, a diferencia de la morfina, el tetrapéptido H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ no provoca efectos tóxicos ni trastornos psicológicos ni de conducta.

40 El resultado de los experimentos es que se ha producido un péptido estable que tiene un efecto analgésico 10 veces superior al de la morfina. Una consecuencia importante de estos hallazgos es que la preparación podría usarse en un rango terapéutico más amplio que supera las 200 dosis terapéuticas. Esto significa que el medicamento no representa un peligro grave de sobredosis y se puede usar de manera segura a varias dosis, según la gravedad del dolor.

45 Usando el método de extrapolación, se determinó que la dosis recomendada para humanos oscilará entre 0,01 y 10 mg/dosis, y preferiblemente entre 0,5 y 10 mg/dosis, dependiendo de la naturaleza del dolor.

Se han obtenido los mismos resultados para preparaciones a base de H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH.

Ejemplo 18

Aplicaciones clínicas

50 Uso del compuesto peptídico en pacientes que han sido informados sobre el fármaco y que han dado su consentimiento.

El compuesto peptídico se usó en casos en los que al paciente se le prescribió un analgésico del grupo de la morfina (3ª etapa, según el sistema de la OMS), pero por una razón u otra, el medicamento no estaba disponible. Cuando la terapia con morfina volvió a ser posible, se detuvo el uso del prototipo experimental del fármaco.

- 5 Basándose en la extrapolación de los datos con animales para las dosis para humanos, se decidió utilizar 0,7-3 mg del tetrapéptido activo a una dosis única, administrada mediante inyección subcutánea y bajo la supervisión de un especialista. El fármaco se envasó en una forma liofilizada de 3 mg por vial antes de su uso y se disolvió en 1-3 ml de agua para inyección.

Se registraron los siguientes parámetros:

1. Tiempo de inicio del efecto analgésico, duración del efecto.

- 10 Dinámica del dolor en una escala numérica de 0 a 10: 0, sin dolor, 10, dolor insoportable. El paciente toma notas periódicas sobre el nivel de intensidad del dolor durante el tratamiento para evaluar el efecto analgésico. Por separado, se anota la intensidad del dolor antes de recibir la preparación del prototipo experimental y durante su administración.

2. La actividad física del paciente.

- 15 Medido en una escala: 1, actividad normal, 2, se reduce la actividad; el paciente puede ir a su propio médico, 3, reposo en cama por lo menos el 50% del día, 4, reposo en cama más del 50% del día, 5, reposo en cama completo.

3. Sensaciones subjetivas del paciente.

Cambio de percepción, estado de ánimo, presencia/ausencia de euforia o disforia, malestar en el cuerpo, sensaciones en el aparato digestivo.

- 20 Básicamente, el estudio se realizó en pacientes con tipos de dolor somático e interno, aunque a menudo no fue posible clasificar con precisión el tipo de dolor.

Paciente 1. El paciente es un hombre de 48 años.

Cáncer de páncreas en estadio IV, metástasis. Dolor en una escala de 6-9. Se le prescribieron analgésicos narcóticos.

La dosis aplicada es de 3 mg 2 veces al día. Duración de la terapia 5 días.

Tiempo de analgesia durante 10-15 minutos.

- 25 Sensaciones subjetivas: con la primera inyección, hubo un efecto disfórico muy ligero durante 10-15 minutos, luego el efecto disminuyó. No se observaron trastornos de la conciencia o de la actividad. Autocuidado del paciente.

El grado de analgesia estuvo en una escala de 1-3.

La duración del efecto analgésico fue de 8-12 horas.

Paciente 2. La paciente es una mujer de 72 años.

- 30 Cáncer de colon en estadio IV, metástasis. El dolor no cesa, la paciente grita de dolor, no puede cuidarse y no es capaz de mantener una conversación normal, y prácticamente no duerme.

Se aplica una dosis de 2 mg tres veces durante el primer día, luego se reduce a 1,5 mg 2 veces al día. Duración de la terapia 4 días.

Tiempo de analgesia durante 10-15 minutos.

- 35 Sentimientos subjetivos: la intensidad del dolor se redujo significativamente, recuperó la capacidad de comunicarse, la paciente pudo mantener una conversación, pudo levantarse y caminar normalmente, durmió por la noche. No se detectaron efectos negativos.

El grado de analgesia estuvo en una escala de 2-3.

La duración del efecto analgésico fue de 6-12 horas.

- 40 Paciente 3. La paciente es una mujer de 56 años.

Cáncer de colon en estadio IV, metástasis. Escala de dolor 7-10. Se le prescribieron analgésicos narcóticos.

Se administra una dosis de 1,5 mg 2 veces al día. Duración de la terapia 4 días.

Tiempo de analgesia durante 10-15 minutos.

Sentimientos subjetivos: la intensidad del dolor se redujo significativamente, la paciente pudo mantener una conversación y pudo levantarse y caminar. No se detectaron efectos negativos.

El grado de analgesia estuvo en una escala de 1-3.

La duración del efecto analgésico fue de 8-10 horas.

5 Paciente 4. La paciente es una mujer de 61 años.

Cáncer de mama en estadio IV, metástasis. Escala de dolor 7-10. Se le prescribieron analgésicos narcóticos.

Se aplicó una dosis de 1,5 mg 2 veces al día. Duración de la terapia 5 días.

Tiempo de 10-20 minutos de efecto analgésico.

10 Sentimientos subjetivos: Sin sentimientos de euforia o disforia, la intensidad del dolor se redujo significativamente y la paciente pudo mantener una conversación. No se detectaron efectos negativos.

El grado de analgesia estuvo en una escala de 1-3.

La duración del efecto analgésico fue de 8-10 horas.

Paciente 5. La paciente es una mujer de 53 años.

Cáncer de mama en estadio IV, metástasis. Dolor en una escala de 7-8. Se le prescribieron analgésicos narcóticos.

15 La dosis aplicada es de 0,7 mg dos veces al día 1,3, 1, 4,6 mg por día. Duración de la terapia 6 días.

Tiempo de analgesia durante 10-15 minutos.

Sentimientos subjetivos: Sin sentimientos de euforia o disforia, la intensidad del dolor se redujo significativamente, la paciente pudo mantener una conversación. No se detectaron efectos negativos.

El grado de analgesia estuvo en una escala de 1-3.

20 La duración del efecto analgésico fue de 8-10 horas.

Paciente 6. La paciente es una mujer de 64 años.

Una fractura por compresión de una vértebra en la región lumbar. Dolor en una escala de 7-8. No puede moverse sin ayuda.

Se le prescribió una dosis de 1,5 mg 2 veces al día. La terapia tuvo una duración de 2 días.

25 Tiempo de analgesia durante 10-15 minutos.

Sentimientos subjetivos: Sin sentimientos de euforia o disforia, la intensidad del dolor se redujo significativamente, la paciente pudo viajar a otra ciudad para continuar con el tratamiento. No se detectaron efectos negativos.

El grado de analgesia estuvo en una escala de 1-3.

La duración del efecto analgésico fue de 8-12 horas.

30 Se puede confirmar, en todos los casos anteriores, que no hay reacciones adversas, como alteración de la conciencia, euforia o disforia, problemas con el tracto digestivo, ningún signo de depresión respiratoria ni trastornos cardíacos. Los pacientes a los que se les administró el fármaco prototipo pudieron tener una comunicación normal con sus familiares.

35 Ventajosamente, en cualquier compuesto, composición, composición farmacéutica o medicamento o péptido analgésico, o cualquier preparación, método de tratamiento, método de administración, método de aplicación o uso del mismo, de la presente invención, se puede usar uno o ambos de los siguientes tetrapéptidos:

- Tetrapéptido que tiene una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂
- Tetrapéptido que tiene una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH

40 Tanto si se usa uno de los tetrapéptidos como si se usa una combinación de ambos tetrapéptidos enumerados anteriormente, se logran los efectos ventajosos que se especifican a lo largo de la memoria descriptiva.

La invención descrita en la presente memoria puede incluir uno o más rangos de valores (por ejemplo, tamaño, concentración, etc.). Se entenderá que un rango de valores incluye todos los valores dentro del rango, incluidos los

valores que definen el rango, y los valores adyacentes al rango que conducen al mismo o sustancialmente al mismo resultado que los valores inmediatamente adyacentes a ese valor que define el límite del rango.

5 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender" o las variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. También se observa que en esta descripción, y particularmente en las reivindicaciones y/o los párrafos, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes de EE. UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares; y que 10 términos tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los EE. UU., p. ej. tienen en cuenta elementos que no se indican explícitamente, pero excluyen elementos que se hallan en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

15 En la descripción detallada de la invención se pueden encontrar otras definiciones para los términos seleccionados que se utilizan en la presente memoria y que se aplican en toda su extensión. A menos que se defina de otro modo, todos los demás términos científicos y técnicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

Lista de referencias

1. Montecucchi PC et al.: Amino acid composition and sequence of dermorphin, a novel opiate-like peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res.* Marzo de 1981; 17(3):275-83.
- 20 2. Sasaki Y. et al.: The analgesic activity of D-Arg2-dermorphin and its N-terminal tetrapeptide analogs after subcutaneous administration in mice. *Neuropeptides* 1985; 5, ls. 4-6:391-394.
3. Chaki K. et al.: Comparison of the antinociceptive effects of new [D-Arg2]-dermorphin tetrapeptide analogs and morphine in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* Octubre de 1988; 31(2):439-44.
- 25 4. Chaki K. et al.: Antinociceptive cross-tolerance between [D-Arg2]-dermorphin tetrapeptide analogs and morphine. *Peptides.* Enero-febrero de 1990; 11(1): 139-44.
5. Chaki K. et al.: Antinociception and physical dependence produced by [D-Arg2] dermorphin tetrapeptide analogues and morphine in rats. *Br J Pharmacol.* Septiembre de 1988; 95(1):15-22.
6. DeLean A. et al.: Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol.* Agosto de 1978; 235(2):E97-102.
- 30 7. Susan J. et al.: Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein. *Anesthesiology*, 2000, V. 92, P. 1392-9.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el uso en la prevención y/o el tratamiento del dolor agudo y/o crónico en un sujeto, que comprende un péptido analgésico que tiene una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH₂ o una secuencia de aminoácidos H-Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH, donde la composición es una forma farmacéutica líquida inyectable y/o una forma nasal, donde las formas farmacéuticas líquidas para inyección comprenden el péptido analgésico en una cantidad del 0,1 al 2 % en masa y un excipiente hasta el 100 % y la forma nasal comprende el péptido analgésico en una cantidad del 0,05 al 2 % en masa y un excipiente hasta el 100 %, y donde las formas farmacéuticas líquidas para inyección y la forma nasal son estables a temperatura ambiente temperatura y tienen una vida útil de al menos 2 años, y donde el excipiente comprende un tampón en una cantidad del 0,01-0,2 % en masa, donde el tampón comprende acetato de sodio.
2. La composición para el uso según la reivindicación 1, que comprende al menos un excipiente adicional seleccionado del grupo que consiste en: estabilizantes, prolongadores, emulsionantes/solubilizantes, disolventes, rellenos, conservantes y otros excipientes permitidos para uso médico.
3. La composición para el uso según la reivindicación 2, donde el estabilizante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: Trilon B, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, glicina, arginina, histidina, lisina o sus sales fisiológicamente aceptables, tales como clorhidrato, sulfato, acetato, glutamato, aspartato y maleato.
4. La composición para el uso según la reivindicación 2, donde el prolongador comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: polivinilpirrolidona que tiene un peso molecular de 10-60 kDa, dextrano con un peso molecular de 10-100 kDa, poli(alcohol vinílico) y carboximetilcelulosa sódica.
5. La composición para el uso según la reivindicación 1, donde el tampón comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: cloruro de sodio, monohidrógeno y/o dihidrógeno fosfato de sodio/potasio y acetato de amonio.
6. La composición para el uso según la reivindicación 2, donde el emulsionante/solubilizante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: lecitina de soja para inyección, polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, Span 20, Span 40, Span 60, Span 85 y dodecilsulfato de sodio.
7. La composición para el uso según la reivindicación 2, donde el disolvente comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: agua para inyección, solución salina estéril, aceite de oliva, aceite de semilla de melocotón y aceite de girasol.
8. La composición para el uso según la reivindicación 2, donde el relleno comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: sorbitol, manitol, xilitol, lactosa, sacarosa, dextrosa, un copolímero de ácidos láctico y glicólico.
9. La composición para el uso según la reivindicación 2, donde el conservante comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en: hidrato de clorobutanol, alcohol etílico (etanol), alcohol bencílico, fenol, cresol, metacresol, clorocresol, ácido benzoico, ácido sórbico, mertiolato, nipagina, nipasol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro o bromuro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de lauril dimetil bencil amonio.
10. La composición para el uso según la reivindicación 1 a 9, donde la composición en forma líquida tiene un pH de 4 a 8, preferiblemente 4,5-5,5.
11. La composición según la reivindicación 10, donde la forma farmacéutica líquida para administración mediante inyección comprende en % en masa lo siguiente:

Acetato sódico	0,01-0,2
Cloruro sódico	0-1
Manitol	0-6
Glicina	0-4
Sustancia tetrapeptídica	0,1-2
Agua	Hasta 100

12. La composición según la reivindicación 10, donde la forma líquida para administración nasal comprende en % en masa lo siguiente:

Acetato sódico	0,01-0,2
Cloruro sódico	0-1
Manitol	0-1,5
Glicina	0-1,5
Sustancia tetrapeptídica	0,01-5
Metacresol	0-0,5
Disolvente	Hasta 100

5 13. La composición según la reivindicación 11, donde la forma líquida para inyección comprende en % en masa lo siguiente:

Acetato sódico 0,04

Cloruro sódico 0,5

Manitol 0,5

Glicina 0,5

10 Tetrapéptido 0,2

Agua para inyección hasta 100, pH a 4,7

14. La composición según la reivindicación 12, donde la forma líquida para administración nasal contiene preferiblemente en % en masa lo siguiente:

Acetato sódico 0,04

15 Cloruro sódico 0,5

Manitol 0,5

Glicina 0,5

Tetrapéptido 0,15

Cresol 0,1

20 Agua hasta 100, pH a 4,7