

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 901 193**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2019** **E 19155156 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021** **EP 3556377**

54 Título: **Una composición medicinal nasal para uso en el tratamiento de infecciones víricas respiratorias agudas**

30 Prioridad:

18.04.2018 RU 2018114273

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

21.03.2022

73 Titular/es:

PVP LABS PTE. LTD. (100.0%)
1 Coleman Street 10-06
The Adelphi, Singapore 179803, SG

72 Inventor/es:

CHERTORIZHSKY, EVGENY ALEXANDROVICH;
OVCHINNIKOV, MIKHAIL VLADIMIROVICH y
KLEIMENOV, ALEKSEY VIKTOROVICH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 901 193 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 composición medicinal nasal para uso en el tratamiento de infecciones víricas respiratorias agudas

Campo de la invención

5 La invención que se define en las reivindicaciones 1-12 es relativa a la medicina, en particular a la farmacología, y se refiere a la aplicación de una composición medicinal nasal que contiene el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su sal farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de las infecciones respiratorias agudas víricas (IRAV), en particular las causadas por el virus de la gripe.

En particular, la invención se refiere a una composición medicinal nasal para su uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias agudas víricas (IRAV).

10 Antecedentes de la invención

15 Las infecciones respiratorias agudas víricas (IRAV) son actualmente el tipo de infección más común y representan más del 90 % del total (consulte la Referencia [1] a continuación). Según la Organización Mundial de la Salud, cada año se notifican más de 40 millones de casos nuevos. La carga social de las IRAV se caracteriza principalmente por altos costos indirectos, tales como los costos por el período de ausencia en el lugar de trabajo, las pérdidas económicas debido a la reducción de la productividad laboral y los costos de la ausencia en el lugar de trabajo de los miembros de la familia que cuidan a los pacientes (las pérdidas económicas en los EE. UU. por incapacidad temporal solo se evalúan en 232 millones de dólares) [2].

20 Este problema también es extremadamente relevante para Rusia, ya que, según cifras oficiales, en la Federación de Rusia se notifican anualmente entre 27,3 y 41,2 millones de casos de infecciones del tracto respiratorio. Esta enfermedad, con un peso específico elevado en la estructura de morbilidad global, representa casi el 40 % de los días de incapacidad [3].

25 Actualmente se conocen más de 200 virus que causan enfermedades similares a la gripe. El análisis de los resultados de numerosos estudios de la estructura de las causas de las IRAV, que fueron realizados en diferentes países por diferentes equipos de investigación, demuestra que los patógenos más comunes incluyen rinovirus, virus de la gripe, virus de la paragrape, virus respiratorio sincitial (VRS), coronavirus, bocavirus y adenovirus [4].

30 Los virus de la gripe pertenecen al grupo de los ortomixovirus y tienen forma esférica. La parte interna del virus consiste en un complejo de isopolimerasa (PA, PB1, PB2), una ribonucleoproteína y una proteína de matriz. En el exterior, el virus está cubierto por una envoltura con dos tipos de antígenos de superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Estas estructuras permiten que el virus se adhiera a la célula hospedadora y la penetre. Los antígenos de superficie exhiben variabilidad, lo que da lugar a nuevas cepas del virus de la gripe. La mayor variabilidad la exhiben los virus de la gripe A, que son capaces de causar, en poco tiempo, epidemias de gripe en todo el país o pandemias de gripe en todo el continente. Según el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), las epidemias de gripe estacional causan 200 mil hospitalizaciones por año, mientras que la mortalidad es de 1,4-1,67 por cada 100 mil habitantes [5]. Una pandemia de gripe que comenzó en 2009 fue causada por un virus de la gripe A (H1N1) con potencial pandémico. Este virus llegó a Rusia más tarde, y se notificó el mayor número de pacientes en 2010-2011 y 2015 [6]. Las investigaciones farmacoepidemiológicas de muestreo llevadas a cabo en 1462 pacientes demostraron que las personas de entre 18 y 49 años representaban el 84,7 % de los pacientes [7].

40 Por lo tanto, la prevención de la propagación de este grupo de enfermedades es un objetivo importante para cualquier país. Por consiguiente, se encuentran disponibles varios métodos para el tratamiento y la prevención de este grupo de enfermedades.

45 En concreto, la vacunación masiva de la población es la principal medida profiláctica destinada a prevenir epidemias. Las vacunas se desarrollan anualmente sobre la base de datos epidemiológicos sobre las cepas de virus que circulan dentro de un territorio en particular. Sin embargo, la deriva antigénica del virus de la gripe puede ocurrir después de que se haya desarrollado la vacuna para el año en curso. En los últimos años, las IRAV causadas por varios patógenos diferentes se han convertido en un fenómeno común. Según algunas estimaciones, estos casos afectan al 70 % de los pacientes. Un paciente puede diseminar simultáneamente varios virus, o un virus en combinación con bacterias u otras asociaciones. Ha habido informes que indican que una infección puede estar causada por un virus, con otro virus implicado durante la progresión de la infección, lo que puede agravar el curso clínico de la enfermedad. Estas infecciones mixtas a menudo agravan el estado del paciente, prolongan la enfermedad, pueden exacerbar enfermedades crónicas preexistentes o contribuir a complicaciones secundarias [8].

55 Adicionalmente, el tratamiento de las enfermedades respiratorias víricas implica fármacos antivíricos, incluidos péptidos con efecto antivírico. Por ejemplo, los péptidos antimicrobianos (PAM) son moléculas de la propia defensa inmunitaria del hospedador, que probablemente son producidas por todas las plantas y animales multicelulares. Son la primera línea de inmunidad congénita, que elimina rápidamente los patógenos invasores durante las primeras etapas de la infección y puede causar una respuesta inmune adaptativa sistémica. La mayoría de los PAM son moléculas anfipáticas y catiónicas capaces de unirse a las membranas microbianas, que suelen portar una carga

negativa. Se han identificado y clasificado cientos de PAM por sus características estructurales y/o composición de aminoácidos. Dos familias de PAM en vertebrados, las catelicidinas y las defensinas, son moléculas pequeñas que son producidas principalmente por leucocitos y células epiteliales.

5 Es conocida en el estado de la técnica una composición que contiene esta clase de péptidos, donde el péptido puede suprimir diversas infecciones respiratorias víricas. Gracias a un dominio funcional capaz de unirse a la glicoproteína de superficie de un virus respiratorio, el péptido puede unirse a la glicoproteína de superficie del virus y llegar al interior de los endosomas por endocitosis. Como el péptido es rico en aminoácidos básicos, puede prevenir la disminución del pH en los endosomas tardíos, bloqueando así la fusión de las membranas vírica y endosómica y la posterior degradación del virus con la liberación de ARN vírico. Por lo tanto, el péptido demuestra una gran capacidad para
10 bloquear infecciones causadas por virus respiratorios, como diversos subtipos de virus de la gripe y coronavirus; puede usarse para bloquear infecciones de células diana con virus respiratorios y para prevenir o tratar infecciones respiratorias víricas (patente RU 2639559, 21/12/2017).

15 Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el uso de tales productos se ve obstaculizado por la variabilidad del material genético de los virus; en consecuencia, su efecto se limita a un patógeno específico que responde a este tipo de tratamiento.

También se utiliza el tratamiento con productos combinados. Por ejemplo, puede considerarse aconsejable el uso de productos combinados con efecto antipirético, analgésico, antiedematoso y angioprotector para el tratamiento sintomático de las IRAV en la práctica clínica diaria. El uso de fármacos sintomáticos combinados se asocia con una incidencia reducida de eventos adversos en relación con un conjunto de fármacos de un solo componente, y es más
20 razonable económicamente [9].

Sin embargo, el uso de este tipo de fármacos descuida la importancia de conservar la función respiratoria nasal y los factores de inmunidad local específicos y no específicos en pacientes con IRAV.

25 Mientras tanto, las causas de las IRAV incluyen cambios en la función de la respiración nasal, que está asociada con el funcionamiento de los mecanismos mediante los cuales los patógenos se retiran del aire inhalado. Esta función depende de la producción de factores de protección inmunitaria no específicos y específicos por la mucosa nasal y del aclaramiento mucociliar.

El efecto preventivo y terapéutico de tales productos está directamente relacionado con su capacidad para retirar los factores orgánicos e inorgánicos agresivos del aire inhalado de la cavidad nasal y normalizar la inmunidad específica y no específica y el aclaramiento mucociliar.

30 El uso de productos que activan la resistencia no específica del cuerpo es un área prometedora de tal prevención. Los inductores de interferones endógenos, como Tilonon, Arbidol y Cycloferon, se usan ampliamente en la práctica clínica rusa con este propósito.

35 El dipéptido α -glutamil-triptófano en forma de sal sódica es conocido por la bibliografía (patente de la Federación de Rusia 2107691, 1998). Este péptido se usa como inmunomodulador que afecta la respuesta inmune humoral y mediada por células y la resistencia no específica del cuerpo. Estimula los procesos de regeneración si se suprimen y mejora el metabolismo celular. También promueve la diferenciación de las células linfoides y puede estimular la actividad formadora de colonias de las células de la médula ósea, induce la expresión de receptores de diferenciación en los linfocitos, normaliza el número de células T auxiliares y células T supresoras y su relación en pacientes con una variedad de afecciones inmunodeficientes.

40 Este péptido se usó en una composición para administración nasal, que se aplicó para la prevención y/o tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio superior, en particular, infecciones respiratorias agudas víricas (IRAV), incluida la gripe. La composición contiene ingredientes activos y excipientes; las sustancias activas incluyen sal marina y α -glutamil-triptófano en la siguiente relación (% en peso):

- sal marina: 95,00-98,00;
- 45 • α -glutamil-triptófano: 2,00-5,00 (patente RU2540496, publicada el 10-Feb-2015).

Este medicamento nasal contiene ingredientes de agua de mar y permite el lavado activo de la cavidad nasal, ayudando a eliminar la mucosidad, reducir la secreción infectada y la hinchazón de la mucosa nasal, suavizar y retirar las costras. El producto normaliza la función protectora del epitelio ciliar de la mucosa nasal y mejora la respiración nasal.

50 Sin embargo, el uso de sal marina como ingrediente adicional no potencia exactamente la actividad del dipéptido; en cambio, esta degrada su estabilidad y actividad. Debido a esto, a pesar de que la memoria descriptiva de la patente menciona la propiedad inmunomoduladora conocida general del péptido, no cubre los resultados directos de investigaciones o comparaciones de eficacia con los productos antivíricos actualmente en uso, lo que hace imposible evaluar el mecanismo de acción antivírico del producto, su eficacia antivírica o selectividad.

Estos inconvenientes requieren el desarrollo de nuevos productos basados en péptidos con un efecto antivírico

pronunciado, que desencadenan mecanismos fisiológicos que inhiben el desarrollo de las IRAV.

En particular, es conocido en el estado de la técnica el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina (designado como dalargina), que es un análogo estructural sintético del pentapéptido regulador de opioides endógeno leucina-enkefalina (H₂N-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-COOH, peso molecular 555,6 uma).

- 5 La dalargina exhibe una afinidad no específica por los receptores opioides μ (mu), δ (delta) y κ (kappa), lo que explica el amplio espectro de su actividad biológica: propiedades analgésicas [9] y antioxidantes [10]. Está registrado en Rusia como un producto para reducir la acidez del jugo gástrico y la actividad secretora exocrina del páncreas (base de datos del Registro Estatal de Medicamentos, Rusia). Adicionalmente, es conocido que la sustancia exhibe un efecto hipotensor y cronotrópico positivo [11].
- 10 Hasta ahora, se han registrado decenas de patentes que demuestran diversos efectos de la dalargina. La patente RU 2196603 divulga el uso de dalargina para el tratamiento de quemaduras como parte de la terapia de infusión. Las patentes UA 6829U, UA 6823U y UA 6826U divulgar el uso de dalargina para el tratamiento de la pancreatitis aguda experimental. El uso de dalargina como agente antiestrés estaba cubierto por las patentes UA 67632, UA 67630 y UA 67629 en modelos experimentales de pancreatitis crónica, anexitis aguda y peritonitis respectivamente. La actividad antiestrés de la dalargina se demostró en la patente UA 67626 en un modelo de estrés crónico experimental. Dontsov AV, "Dalargin in the correction of anxiety and depressive disorders in patients with metabolic syndrome", BIOSIS, BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, FILADELFIA, PA, EE. UU., (2013) describe la administración endonasal de dalargina para su uso en el tratamiento de la ansiedad y los trastornos depresivos en pacientes con síndrome metabólico. La patente RU2323019 describe la administración de dalargina para su uso en el tratamiento de la sordera neurosensorial postraumática en la etapa aguda causada por la explosión de una mina en combinación con el uso paralelo de la electropunción. Buglak N.P. et al, "The use of dalargin for treating duodenal peptic ulcer recurrences on an outpatient basis", MEDLINE, BIBLIOTECA NACIONAL DE MEDICINA DE LOS EE. UU. (NLM), BETHESDA, MD, EE. UU., (199407) describen la administración intranasal de dalargina para su uso en el tratamiento de las recurrencias de la úlcera péptica duodenal, mientras que la patente RU2436588 describe una composición de dalargina intranasal para su uso en el tratamiento de enfermedades ulcerosas gástricas y duodenales, pancreatitis y pancreatonecrosis. Buglak N.P. et al "Use of a dalargin aerosol in treating the exacerbations of uncomplicated duodenal peptic ulcer", MEDLINE, BIBLIOTECA NACIONAL DE MEDICINA DE LOS EE. UU. (NLM), BETHESDA, MD, EE. UU., (198807) describen la composición intranasal de dalargina (aerosol) para su uso en el tratamiento de las exacerbaciones de la úlcera péptica duodenal no complicada.
- 20 La patente RU 2180598 divulga el uso de dalargina para el tratamiento de la hepatitis tóxica en pacientes con adicción crónica a las drogas. La publicación MD1413F divulga el uso de dalargina para el tratamiento de la mucosa oral y el liquen plano, y la publicación MD1296F presenta datos sobre la terapia del liquen plano con dalargina. La solicitud RU 2008131509 presenta una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, que incluye dalargina. La patente RU 2218896 divulga el uso de dalargina para el tratamiento de la queratopatía bullosa.
- 25 Las publicaciones MD1963F y MD1610F cubren el uso de dalargina en casos de ulceración oral crónica recurrente y la patente RU 2230549 cubre su uso para el tratamiento de la dermatosis alérgica.
- 30
- 35

Adicionalmente, la eficacia de la dalargina en el tratamiento de varias enfermedades víricas se demostró en las patentes RU 2261722 (tratamiento de una forma latente de herpes genital en una mujer con síndrome de pérdida fetal) y RU 2167671 (tratamiento de encefalitis transmitida por garrapatas). Sin embargo, estos trabajos no cubren el tratamiento de las IRAV; están relacionados con el tratamiento de otras enfermedades. Adicionalmente, no dan ninguna indicación de un efecto antivírico directo del hexapéptido en cuestión.

40

Además, a pesar de que la patente RU 2241488 describe el uso de dalargina como solución para inyecciones y la solicitud RU 2010152024 describe las propiedades inmunomoduladoras de la dalargina; en particular, se ignora su efecto sobre la producción de citocinas, la actividad de las células citolíticas naturales, la actividad inductora de interferón o los efectos sobre la fagocitosis. En efecto, estos trabajos no logran demostrar la potenciación de la inmunidad local bajo el efecto del hexapéptido.

45

Para resumir lo anterior, los materiales publicados hasta ahora no consideran la actividad antivírica de la dalargina como tal, no divulgan completamente sus propiedades inmunomoduladoras y no cubren la viabilidad de usar este producto en la terapia de IRAV.

50 **Objeto y breve resumen de la invención**

Al mismo tiempo, los estudios llevados a cabo por los presentes autores demostraron que los efectos de la dalargina, en particular el efecto antivírico directo, la capacidad de potenciar los factores de inmunidad local y sistémica tras la administración nasal local, permiten su uso como monoterapia o en combinación con otros medicamentos como producto para el tratamiento y la prevención de las IRAV, incluida la gripe. La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 12.

55

Los resultados permitieron a los autores desarrollar y proponer para su aplicación una composición medicinal nasal que contiene el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su sal farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de infecciones respiratorias agudas víricas (IRAV), en particular las causadas por el virus de la gripe.

En una realización particular de la invención, esta enfermedad es la gripe.

En una realización particular de la invención, la sal farmacéuticamente aceptable es diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina.

5 En una realización particular, la composición nasal se prepara en forma de pulverizador que contiene, como ingrediente activo, el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su forma farmacéuticamente aceptable al porcentaje en peso del 0,01 % al 3 % y excipientes completando el resto.

En una realización particular de la invención, la composición se caracteriza por contener el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su sal y excipientes farmacéuticamente aceptables en la siguiente relación de los componentes en % en masa: hexapéptido: 0,01-3 %, cloruro de sodio 7-11 %, con agua completando el resto.

10 En una realización particular de la invención, la composición se caracteriza por contener el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su sal y excipientes farmacéuticamente aceptables en la siguiente relación de los ingredientes en % en masa: hexapéptido: 0,01-3 %, con agua completando el resto.

15 En una realización particular de la invención, la composición se caracteriza por contener el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su sal y excipientes farmacéuticamente aceptables en la siguiente relación de los componentes en % en masa: hexapéptido: 0,01-3 %, cloruro de sodio 7-11 %, cloruro de benzalconio 0,1-0,2%, con agua completando el resto.

En una realización particular de la invención, la composición se caracteriza por contener, como excipientes, cloruro de sodio y agua en la siguiente relación de componentes en % en masa: cloruro de sodio 9 %, agua 90 %.

20 En una realización particular de la invención, la composición se caracteriza por contener, como agua, agua para inyecciones.

En una realización particular de la invención, la composición se caracteriza por contener, como agua, agua purificada.

Los resultados técnicos de la invención reivindicada son:

- la ampliación del conjunto de herramientas técnicas para desarrollar composiciones nasales para el tratamiento de IRAV;
- 25 • el desarrollo de productos cuya aplicación puede retirar los factores orgánicos e inorgánicos del aire inhalado de la cavidad nasal y normalizar la protección inmunológica específica y no específica.
- el desarrollo de un producto a base de péptidos capaz de exhibir un efecto antivírico directo sobre los patógenos causantes de IRAV presentes en el organismo y en los portales de entrada.

30 Por lo tanto, la novedad y esencia de esta invención consiste en el desarrollo de un producto en el que se demuestra el efecto antivírico real de la dalargina para los principales patógenos causantes de IRAV: virus de la gripe y adenovirus, y la divulgación completa del componente de actividad inmunomoduladora de la dalargina en la terapia de estas enfermedades.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra un diagrama de concentración de IFN- α en plasma sanguíneo murino después de la administración de dalargina, Arbidol y placebo.

La Figura 2 muestra un diagrama que refleja un efecto de la dalargina sobre la actividad citotóxica de las células citolíticas naturales.

La Figura 3 muestra un diagrama que refleja la supresión de la síntesis de citocinas proinflamatorias bajo el efecto de la dalargina.

40 La Tabla 1 muestra las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI50) y la actividad de los productos de comparación en relación con la cepa de referencia del virus de la gripe A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) en el cultivo de tejido de MDCK.

Tabla 1

Tratamiento	Inhibición de la reproducción del virus	
	CMI50, $\mu\text{g/ml}$	Actividad a 10 $\mu\text{g/ml}$ (relación de células viables en %)
Arbidol	6,0	100
Dalargina	0,8	100

La Tabla 2 muestra la eficacia antivírica de los compuestos en un modelo de neumonía inducida por gripe en ratones.

Tabla 2

Grupo	Tasa de supervivencia	% de mortalidad	Vida media
Dalargina (IM, 2 mg/kg/día, n = 10)	9/10	10	14,0
Dalargina (por vía intranasal, 2 mg/kg/día, n = 10)	8/10	20	12,5
Arbidol (por vía oral, 60 mg/kg/día, n = 10)	7/10	30	11,2
Control (placebo, n = 10)	2/10	80	8,5

La Tabla 3 muestra la eficacia de la dalargina frente a adenovirus de tipo 5 en un cultivo monocapa de células HeLa.

5

Tabla 3

Régimen de dosificación	Dalargina (dosis, µg/ml)	Tasa de detección del ECP	Supresión del ECP (Ki, %)
24 horas antes de la exposición	100,0	1/10	90,0
	20,0	4/10	60,0
	10,0	6/10	40,0
2 horas después de la exposición	100,0	2/10	80,0
	20,0	5/10	50,0
	10,0	8/10	20,0
Control (sin tratamiento)	-	10/10	-
Control de medio	-	0/10	-

La Tabla 4 muestra el efecto de la dalargina sobre la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos murinos.

Tabla 4

Neutrófilos		
Grupo	Índice fagocítico	Número de fagocitos
Control (n = 10),	19,1 ± 0,45	2,25 ± 0,10
Dalargina (IM, 0,2 mg/kg, n = 10)	32,43 ± 0,56*	3,01 ± 0,13*
Dalargina (por vía nasal, 0,2 mg/kg, n = 10)	31,87 ± 0,43*	2,93 ± 0,15*
Macrófagos		
Grupo	Índice fagocítico	Actividad fagocítica (%)
Control (n = 10)	55,2 ± 4,6	10,3 ± 0,7
Dalargina (IM 0,2 mg/kg, n = 10)	67,7 ± 6,1*	19,8 ± 1,2*
Dalargina (por vía nasal, 0,2 mg/kg, n = 10)	63,9 ± 5,7*	19,1 ± 1,1*
<i>Comentario: * = nivel de significancia p <0,05 (respecto a los controles)</i>		

10 Descripción de ejemplos de la invención

A continuación, se presentan ejemplos de implementación de la invención.

Ejemplo 1. Preparación de dalargina

Un método de producción de dalargina y su sal farmacéuticamente aceptable se describió previamente y es un método clásico de síntesis de péptidos. A continuación, se proporciona una descripción de un método de síntesis de dalargina.

15 Síntesis de H-Phe-Leu-Arg

Disolver 750 g de Z-Leu-ONSu en 3 L de DMF, añadir 368 g de Arg a la solución resultante, agitar durante 24 horas.

Evaporar la DMF en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de paletas rotativas. Disolver el aceite resultante en 15 l de butanol y transferir a un desecador de vidrio equipado con un agitador. Añadir 10 l de agua destilada al desecador. Agitar durante 5 minutos hasta que las capas se hayan separado por completo (10-24 horas). Decantar el agua en un bote limpio. Lavar la capa orgánica 3 veces más con porciones de 3 l de agua destilada.

5 Agrupar la capa acuosa y el agua de enjuague y extraer adicionalmente con 4 l de butanol. Evaporar el butanol en un evaporador rotatorio a 43 °C al vacío de una bomba de diafragma.

Disolver el aceite resultante de Z-Leu-Arg en 3 l de etanol. Transferir la solución a un reactor de hidrogenación. Añadir 50 g de Pd/C suspendido en 1,5 l de agua. Antes de la hidrogenación, purgar el reactor con nitrógeno. Presurizar el reactor con hidrógeno a 2 kgf/cm² y poner en marcha la bomba de recirculación, manteniendo la temperatura a 43 °C o menos. Filtrar el catalizador, lavar el reactor con 2 l de agua destilada, luego lavar el catalizador en el filtro con la misma agua. Evaporar el filtrado en un evaporador rotatorio a 43 °C al vacío de una bomba de diafragma.

10

Disolver el aceite resultante de H-Leu-Arg en 3 l de DMF y evaporar 1 l en un evaporador rotatorio al vacío de una bomba de paletas rotativas. Añadir una solución de 785 g de Z-Phe-ONSu en 2 l de DMF a la solución resultante y agitar durante 24 horas. Evaporar la DMF en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de paletas rotativas. Disolver el aceite resultante en 15 l de butanol y transferir a un desecador de vidrio equipado con un agitador. Añadir 10 l de agua destilada al desecador. Agitar durante 5 minutos. Lavar la capa orgánica 3 veces más con porciones de 3 l de agua destilada. Agrupar la capa acuosa y el agua de enjuague y extraer adicionalmente con 4 l de butanol. Agrupar las porciones de butanol y evaporar el butanol en un evaporador rotatorio a 43 °C al vacío de una bomba de diafragma.

15

Disolver el aceite resultante de Z-Phe-Leu-Arg en 3 l de etanol, para hacer 6 l de la solución. Transferir la solución a un reactor de hidrogenación. Añadir 50 g de paladio sobre carbón suspendido en 1,5 l de agua. Antes de la hidrogenación, purgar el reactor con nitrógeno. Presurizar el reactor con hidrógeno a 2 kgf/cm² y poner en marcha la bomba de recirculación. La recirculación causa calentamiento; mantener la temperatura a 43 °C o menos. Después de filtrar el catalizador, lavar el reactor con 2 l de agua destilada, luego lavar el catalizador en el filtro con la misma agua. Evaporar el filtrado en un evaporador rotatorio a 43 °C al vacío de una bomba de diafragma. Disolver el H-Phe-Leu-Arg resultante en 3 l de DMF (aproximadamente 0,6 moles por kg de solución), luego usar la solución para la reticulación de proteínas.

20

25

Síntesis de Boc-Tyr(Boc)-Ala-Gly-ONP

Disolver 907 g de H-Gly (OBzl)*Tos en 3 l de DMF, ajustar el pH a 7,2-7,5 con N-metilmorfolina. Añadir una solución de 773 g de Boc-Ala-ONSu en 2 l de DMF en una sola porción bajo enfriamiento en un baño de agua. T ≤ 25 °C. Retirar el baño y agitar a temperatura ambiente. Control de TLC. Evaporar la DMF en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de paletas rotativas. Disolver el aceite resultante en 15 l de acetato de etilo y transferir a un desecador de vidrio equipado con un agitador. Lavar la capa orgánica 3 veces con porciones de 3 l de agua. Llevar 200 ml de solución saturada de Na₂CO₃ a 3 l con agua, lavar la capa orgánica con esta solución, luego lavar 3 veces más con porciones de 3 l de agua. Preparar una solución de 6,5 ml de ácido sulfúrico al 20 % en 3 l de agua, lavar la capa orgánica con esta solución, luego lavar 3 veces más con porciones de 3 l de agua. En cada lavado, añadir 0,5 l de acetato de etilo. Evaporar el acetato de etilo en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de diafragma.

30

35

Disolver el Boc-Ala-Gly(OBzl) resultante en 3,4 kg de ácido trifluoroacético enfriado a +5 °C bajo enfriamiento en un baño de hielo y agitación vigorosa. Después de completar la disolución, retirar el baño y agitar durante otras 1,5 horas a temperatura ambiente. Evaporar el TFA en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de diafragma. Luego, coevaporar con 0,5 l de benceno tres veces.

40

Disolver el aceite resultante de H-Ala-Gly(OBzl) en 2,5 l de DMF bajo enfriamiento en un baño de agua, ajustar el pH a 7,2-7,4. Añadir una solución de 1183 g de Boc₂-Tyr-ONSu en 2 l de DMF, T ≤ 25 °C. Retirar el baño y agitar a temperatura ambiente durante 12 horas.

Control de TLC. Evaporar la DMF en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de paletas rotativas. Disolver el aceite resultante en 15 l de acetato de etilo y transferir a un desecador de vidrio equipado con un agitador. Lavar la capa orgánica 3 veces con porciones de 3 l de agua. Llevar 200 ml de solución saturada de Na₂CO₃ a 3 l con agua, lavar la capa orgánica con esta solución, luego lavar 3 veces más con porciones de 3 l de agua. Preparar una solución de 7,5 ml de ácido sulfúrico al 20 % en 3 l de agua, lavar la capa orgánica con esta solución, luego lavar 3 veces más con porciones de 3 l de agua. Evaporar el acetato de etilo en un rotavapor a 41 °C. Disolver el aceite en 2,6 l de alcohol isopropílico caliente y en porciones, durante aproximadamente una hora, añadir 7,5 l de hexano, agitar hasta que se produzca un precipitado. Filtrar el Boc₂-Tyr-Ala-Gly precipitado (OBzl), lavar 2 veces con porciones de 5 l de mezcla de hexano/IPA (4,2/0,8). Secar al aire ambiente. Rendimiento 1300 g.

45

50

Disolver el Boc₂-Tyr-Ala-Gly(OBzl) resultante en 5 l de etanol, para hacer 6 l de la solución. Transferir la solución a un reactor de hidrogenación. Añadir 50 g de paladio sobre carbón suspendido en 1,5 l de agua. Antes de la hidrogenación, purgar el reactor con nitrógeno. Presurizar el reactor con hidrógeno a 2 kgf/cm² y poner en marcha la bomba de recirculación. La recirculación causa calentamiento; mantener la temperatura a 43 °C o menos. Control de TLC en 3 horas. Filtrar el catalizador, evaporar el filtrado en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de diafragma.

55

- Disolver en 2 l de DMF, evaporar 1 l en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de paletas rotativas. Añadir 1 l de DMF y 3,5 l de acetato de etilo, luego añadir una solución de 310 g de nitrofenol en 0,5 l de acetato de etilo y 0,3 l de DMF. Enfriar a 18 °C. Preparar una solución de 470 g de DCC en 0,8 l de acetato de etilo y 0,4 l de DMF. Enfriar a -18 °C. Después del equilibrio térmico, mezclar ambas soluciones y dejarlas durante 24 horas a temperatura ambiente.
- 5 Filtrar la urea precipitada, lavar dos veces con porciones de 2 l de acetato de etilo. Evaporar el filtrado en un evaporador rotatorio al vacío de una bomba de diafragma y luego una bomba de paletas rotativas a 41 °C. Cristalizar el aceite precipitado en isopropanol caliente y hexano en la siguiente relación: tomar 0,8 l de isopropanol y 0,4 l de hexano por 0,6 mol de Boc2-Tyr-Ala-Gly-ONP, agitar hasta que se produzca un precipitado. Filtrar el Boc2-Tyr-Ala-Gly-ONP precipitado, lavar 2 veces con porciones de 5 l de mezcla de hexano/isopropanol (1/2). Rendimiento 1170 g.
- 10 Disolver 530 g de Boc2-Tyr-Ala-Gly-ONP en 1,2 l de DMF y, enfriando en un baño de agua, añadirlo a la cantidad calculada de una solución de H-Phe-Leu-Arg (1/1). Agitar durante 2 horas. Evaporar la DMF en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de paletas rotativas. Disolver el aceite en 3,2 l de isopropanol caliente y añadir en porciones 4,5 l de hexano caliente bajo agitación. Una vez que la solución se enfríe a aproximadamente 40-45 °C, añadir 110 g de ácido acético glacial. Agitar durante 2 horas. Filtrar el Boc2-Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg precipitado, lavar 2 veces con porciones de 1,5 l de mezcla de hexano/isopropanol (2/1). Secar al aire ambiente. Rendimiento 700 g.

Síntesis de dalargina

- Disolver 100 g de Boc2-Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg en TFA con enfriamiento en un baño de hielo. Agitar durante una hora después de que esté completamente disuelto. Evaporar el TFA en un evaporador rotatorio a 41 °C al vacío de una bomba de diafragma. Mezclar el residuo con 1,5 l de éter dietílico, filtrar y lavar 3 veces con éter. Dejar secar al vacío de una bomba de diafragma a 35 °C durante 6 horas. Rendimiento 95 g.
- 20

Ejemplo 2. Preparación de una composición nasal del hexapéptido.

La preparación de una composición que contiene dalargina en forma de pulverizador incluye: preparación de la solución de dalargina, llenado de viales.

- Para preparar la composición nasal, añadir de 0,01 a 3 g del hexapéptido (dependiendo de la composición de la solución) a 50 ml de agua para inyecciones a 20-25 °C. Llevar la solución resultante a 100 ml con agua para inyecciones. Esterilizar la solución resultante mediante filtración por membrana en condiciones asépticas haciéndola pasar por un filtro de 0,22 µm, llenar viales de polímero o vidrio bajo una capa de gas inerte, cerrar los viales con el producto acabado.
- 25

- Adicionalmente, se puede añadir cloruro de sodio como parte del proceso de preparación de la composición. Para ello, disolver de 7 a 11 g de cloruro de sodio (dependiendo de la composición de la solución) en 50 ml de agua para inyecciones a 20-25 °C bajo agitación. Luego añadir de 0,01 a 3 g del hexapéptido (dependiendo de la composición de la solución) bajo agitación. Llevar la solución resultante a 100 ml con agua para inyecciones. Esterilizar la solución resultante mediante filtración por membrana en condiciones asépticas haciéndola pasar por un filtro de 0,22 µm, llenar viales de polímero o vidrio bajo una capa de gas inerte, cerrar los viales con el producto acabado.
- 30

- Adicionalmente, se puede añadir cloruro de benzalconio como parte del proceso de preparación de la composición. Para ello, disolver de 7 a 11 g de cloruro de sodio (dependiendo de la composición de la solución) y 0,1-0,2 g de cloruro de benzalconio en 50 ml de agua para inyecciones purificada a 20-25 °C bajo agitación. Luego añadir de 0,01 a 3 g del hexapéptido (dependiendo de la composición de la solución) bajo agitación. Llevar la solución resultante a 100 ml con agua purificada. Esterilizar la solución resultante mediante filtración por membrana en condiciones asépticas haciéndola pasar por un filtro de 0,22 µm, llenar viales de polímero o vidrio bajo una capa de gas inerte, cerrar los viales con el producto acabado.
- 35
- 40

Este método se puede usar para producir formulaciones de la siguiente composición:

Nombre	Contenido, g/ml
Hexapéptido (como sal fisiológicamente aceptable)	0,01-3
Agua para inyecciones	hasta 100 ml
Nombre	Contenido, g/ml
Hexapéptido (como sal fisiológicamente aceptable)	0,01-3
Cloruro de sodio	7-11
Agua para inyecciones	hasta 100 ml
Nombre	Contenido, g/ml

Nombre	Contenido, g/ml
Hexapéptido (como sal fisiológicamente aceptable)	0,01-3
Cloruro de sodio	7-11
Cloruro de benzalconio	0,1-0,2
Agua purificada	hasta 100 ml

A continuación, se presentan los resultados de los experimentos que confirman la eficacia de la dalargina como producto antivírico e inmunomodulador. Los estudios proporcionados en estos ejemplos se diseñaron y realizaron de acuerdo con las directrices de procedimiento eficaces relativas al desarrollo preclínico de medicamentos antivíricos, productos inmunomoduladores e inductores de interferón [17].

5 **Ejemplo 3. Investigación in vitro de la actividad antivírica del hexapéptido frente a la cepa de referencia del virus de la gripe A/H1N1**

Se realizó una prueba con respecto a Arbidol usando cepas del virus de la gripe A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1) en un modelo de cultivo de tejido de MDCK.

10 Como Arbidol exhibía un efecto inhibitor del 100 % (sobre la reproducción de cepas de virus epidémicos) a una concentración de 10,0 µg/ml, esta concentración en agua se eligió para comparar la eficacia antivírica de los productos en condiciones de idéntico grado de infección con el virus de la gripe A.

Adicionalmente, se calcularon las concentraciones que inhiben la reproducción del virus en un 50 % (CMI50) para cada producto.

15 Puede verse en los datos presentados en la Tabla 1 (Anexo 4) que ambas sustancias exhiben una alta actividad antivírica con respecto a las cepas del virus de la gripe A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), teniendo el hexapéptido valores de CMI más bajos en concentraciones extremadamente bajas en solución.

Ejemplo 4. Investigación de la eficacia antivírica de la dalargina con respecto al virus de la gripe A en un modelo de neumonía en ratones

20 Los ratones (n = 40, hembras BALB, peso medio 18-22 g) se expusieron por vía intranasal al virus de la gripe A/Aichi/2/69 (H3N2) bajo una suave anestesia con éter. La dosis de virus que contenía 10 DL50 se determinó de antemano. Para ello, grupos de 5-6 diluciones de ratones (de 10⁻¹ a 10⁻⁶). Los datos sugerían que la DL50 correspondía a una dilución 10⁻³ del virus. A continuación, todos los animales se expusieron a una dosis letal media de 10 veces del virus en 50 µl.

25 Se eligió Arbidol como control activo. Se compusieron aleatoriamente cuatro grupos de animales (10 animales cada uno) (por asignación al azar):

- grupo de control (solución salina);
- grupo de Arbidol;
- grupo de dalargina IM;
- grupo de dalargina intranasal.

30 Régimen de dosificación de dalargina, Arbidol y placebo: 24 h y 1 h antes de la exposición, luego cada 24 horas después de la exposición durante 5 días. La dalargina se administró a una dosis diaria de 2 mg/kg IM o por vía intranasal. El Arbidol se administró a través de un tubo estomacal (por vía oral).

35 La dalargina se administró como una composición farmacéutica diluida a la concentración requerida como en el Ejemplo 2, con o sin cloruro de sodio, con el fin de alcanzar los volúmenes recomendados para la vía de administración intramuscular (0,5 ml) o intranasal (0,01 ml).

Los animales tratados y de control se monitorizaron diariamente. Los ratones se pesaron los días 3, 5 y 15 después de la exposición.

La actividad quimioterapéutica de los compuestos en el modelo de neumonía inducida por gripe en ratones se evaluó usando dos criterios: 1) vida media y 2) pérdida de peso a lo largo del tiempo (con respecto al grupo de control).

40 La vida media de los ratones se calculó usando la fórmula $MSD = f \cdot (d-1)/n$, donde f es el número de ratones que murieron el día d; los ratones supervivientes también se incluyen en f, y d en este caso es 15; n es el número de ratones del grupo). \sum

Los ratones se pesaron los días 3, 5 y 15 después de la exposición. La pérdida o ganancia de peso se calculó por

separado para cada ratón y se expresó en porcentaje. El peso del animal antes de la exposición se tomó como 100 %. Se calculó el porcentaje medio de pérdida o ganancia de peso para todos los ratones dentro de un grupo.

5 En el grupo de control, la pérdida de peso era mayor el día 5 después de la exposición. En los grupos que recibieron los fármacos de prueba, la reducción de peso era estadísticamente significativamente menor que en ambos grupos de control. Los grupos que recibieron Arbidol o dalargina no mostraban diferencias significativas en la pérdida de peso a lo largo del tiempo entre sí.

10 La vida media de los ratones del grupo de control era la más baja, 8,5 días. El tratamiento con Arbidol o dalargina aumentaba la vida media de los animales, que creció a 11-14 días. Sin embargo, la terapia, aunque permitía aumentar la proporción de animales que sobrevivían después de la exposición (con respecto al placebo), no lograba prevenir completamente la mortalidad animal (Tabla 2 - Anexo 4).

15 Los datos indican que la administración IM o intranasal de dalargina a 2 mg/kg/día durante 5 días reduce la mortalidad de los ratones debido a neumonía inducida por la gripe y reduce la pérdida de peso con respecto al placebo. La dalargina demostraba una mayor eficacia con respecto a Arbidol en términos de vida media y tasa de supervivencia. La administración intramuscular e intranasal de dalargina procuraba resultados similares en términos de actividad antivírica.

Ejemplo 5. Ensayo experimental de la eficacia antivírica de la dalargina con respecto a la infección por adenovirus

20 El trabajo se realizó usando adenovirus de tipo 5, que se adquirió en 1998 en el Instituto de Investigación de Virología D.I. Ivanovsky y se almacenó en la Colección Especializada de una rama del 48º Instituto Central de Investigación del Ministerio de Defensa de Rusia - Centro de Computación.

Se usó un cultivo de tipo HeLa (células de carcinoma cervical) con una densidad de 200-250 mil/ml. Se usaron medios de crecimiento semisintéticos a base de solución de Hank que contenía 7,5 y 2 % de suero bovino, respectivamente. Se infectó un cultivo en monocapa de 48 horas de células HeLa con adenovirus de tipo 5 a una dosis de 0,01 TCID50 por célula. A continuación, se incubó el cultivo en monocapa a $37 \pm 0,5$ °C durante 96 horas.

25 La actividad antivírica del producto se evaluó mediante la supresión del efecto citopatogénico (ECP) del virus en el cultivo de HeLa después de que el virus se aplicara a un cultivo en monocapa establecido de células HeLa.

Los criterios de eficacia del fármaco de prueba eran: tasa de detección de ECP y constante de inhibición (K_i , %). La constante de inhibición se calculó según la siguiente fórmula: $K_i = 100 \cdot (C_c - C_t) / C_c$, donde C_c y C_t son el título infeccioso del virus en la muestra de control y la muestra de prueba, respectivamente.

30 Cuando se administraba dalargina 24 h antes de que el cultivo en monocapa fuera expuesto al adenovirus a una dosis de 0,01 TCID50 por célula a concentraciones de 100, 20 y 10 µg/ml, el producto protegía casi por completo a las células del efecto citopatogénico del virus. A 10 µg/ml, la eficacia protectora del producto era del 40,0 %. Cuando se administraba dalargina al medio de mantenimiento 24 h antes de la exposición, la eficacia protectora del producto aumentaba en un 10-20 % con respecto a la administración del fármaco 2 horas después de la exposición.

35 Por lo tanto, la aplicación de dalargina suprimía la reproducción del adenovirus de tipo 5 en un cultivo monocapa de HeLa, y los resultados corroboran la eficacia antivírica del fármaco de estudio con respecto a la infección por adenovirus (Tabla 3).

Ejemplo 6. Evaluación del efecto inductor de interferón de la dalargina en ratones

40 En todas las infecciones víricas, los interferones (INF) se producen como parte de la respuesta temprana de las citocinas. Causan que los ribosomas produzcan una serie de enzimas que inhiben la transcripción y traducción del genoma vírico, lo que suprime la reproducción del virus. Las células alteradas infectadas por el virus se eliminan con la ayuda de células NK y células T citotóxicas, por lo que las defensas antivíricas de las células no infectadas se activan debido al efecto de IFN- α e IFN- β . Por esta razón, la búsqueda de inductores no tóxicos de interferón endógeno, así como las rutas para estimular su producción, son de gran interés e importancia para la virología médica [18, 19].

45 El Arbidol, un producto antivírico con actividad inductora de interferón, se eligió como fármaco de comparación.

50 Los experimentos se realizaron en 40 ratones CBA x C57Bl/6 macho con un peso corporal de 20-25 g. Los animales se asignaron al azar en 4 grupos (de 10 animales cada uno): dos grupos activos (que recibieron dalargina o Arbidol) y dos grupos de control. Un grupo de control estaba destinado a determinar los niveles de INF de valor de referencia (antes del inicio del experimento), el otro grupo estaba destinado a determinar los niveles de INF 24 horas después de la administración de placebo (solución salina), asegurando la equivalencia de las condiciones.

Los animales se alojaron en jaulas en una habitación insonorizada con un ciclo natural de luz y oscuridad a 20-22 °C; el pienso y el agua estaban disponibles a voluntad.

La dalargina se administró a una dosis de 1 mg/kg, que equivale a una dosis humana de 5-6 mg. El Arbidol se administró por vía intragástrica como una premezcla de suspensión en gel de almidón al 1 %. El análisis estadístico se realizó usando la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples.

5 Los niveles de IFN- α en el plasma sanguíneo de ratones se midieron 24 horas después de la administración de los fármacos. Se tomaron muestras de sangre para la determinación de interferón del corazón bajo anestesia con Nembutal (60 mg/kg). Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas para inducir la coagulación, el plasma sanguíneo se separó por centrifugación, se agrupó (2 ratones por grupo), se congeló y se almacenó a -20 °C hasta las pruebas. Los niveles de IFN se determinaron usando kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) disponibles comercialmente fabricados por VeriKine™ (EE. UU.). El ELISA se realizó después de una dilución 10 doble del suero agrupado con los diluyentes recomendados en el manual del fabricante del kit.

15 Se aplicaron las muestras de prueba y los patrones diluidos a la placa por duplicado. En el inmunoensayo en fase sólida empleado, el analito es un antígeno (Ag) con dos sitios de unión (epítomos) y el agente de reconocimiento está representado por dos tipos de anticuerpos monoclonales (Ac) (ELISA de sándwich). Un tipo de Ac se inmoviliza en la fase sólida y se une a un epítomo de la molécula de analito, que está presente en la fase líquida; el segundo tipo de Ac está presente en un conjugado de biotina y se une al segundo epítomo en la molécula de analito. La peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina es el componente indicador. Se usó tetrametilbencidina (TMB) como sustrato en el sistema de detección. La actividad de la peroxidasa unida se midió en un analizador de inmunoensayo UNIPLAN™ (Picon) a 450 nm.

20 Los grupos de control no mostraban diferencias en los niveles de IFN antes y después de la dosificación con placebo (solución salina). Se detectó una elevación numérica (pero insignificante) en los niveles de IFN- α en muestras de suero sanguíneo recolectadas para análisis a las 24 horas después de la dosificación con Arbidol.

Mientras tanto, el grupo de dalargina demostró una producción significativa de INF- α tanto con respecto a los grupos de control como con respecto a Arbidol ($p < 0,001$) (Fig. 1).

Ejemplo 7. Evaluación del efecto de la dalargina sobre la actividad funcional de las células citolíticas naturales (NK)

25 Las células citolíticas naturales son linfocitos granulares de gran tamaño con un fenotipo CD3-CD16+CD56+, que pueden reconocer y destruir las células diana sin sensibilización previa, lo que es especialmente importante en el funcionamiento de la inmunidad antitumoral y en casos de infestación por parásitos intracelulares.

Al evaluar el efecto de la dalargina in vitro sobre la actividad funcional de las células NK, estas células se obtuvieron a partir de una suspensión de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos ($n = 20$).

30 La actividad funcional de las células NK se determinó sobre la base de la reacción citotóxica (las NK pueden lisar células de líneas mieloblastoides y linfoblastoides) usando el ensayo radiométrico. Para realizarlo, se incubaron células de la línea mieloblastoide K-562 a una concentración de 10^6 /ml durante una hora a 37 °C con ^3H -uridina a 3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de la suspensión celular el día 2 después del subcultivo. Después de la incubación, las células se lavaron del radiomarcador en medio 199 tres veces.

35 La reacción citotóxica se llevó a cabo en muestras de 200 μl en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Para ello, se mezclaron 100 μl de células diana marcadas y 100 μl de células mononucleares (efectoras) de la sangre periférica de un donante a una relación de 1:50 por triplicado para cada dilución.

40 En un caso, después de que las células efectoras y las células diana se aplicaran a las placas, se añadió dalargina a una concentración molar de $5 \cdot 10^{-8}$ M ($\sim 0,036$ $\mu\text{g}/\text{ml}$). El fármaco no se añadió a las muestras de control. Con el fin de determinar el marcador liberado, se añadió una cantidad igual de Triton X-100 a las células diana. Luego, las placas se incubaron durante 24 horas en una incubadora de CO₂ a 37 °C, tras lo cual el contenido se transfirió a filtros de fibra de vidrio, se lavó, se secó, se colocó en viales con un líquido de centelleo y se determinó la radioactividad usando un contador de partículas β . El índice de citotoxicidad (IC) se determinó usando la fórmula $\text{IC} = ((A-B)/(C-B)) \cdot 100 \%$, 45 donde A es la radiactividad de las células diana en presencia de células efectoras, B es la radiactividad residual después de tratar las células diana con Triton X -100, C es la radiactividad en las células diana en ausencia de células efectoras.

Como se muestra en la Fig. 2, los resultados de la prueba indican el potencial inmunotrópico de la dalargina con respecto a las células citolíticas naturales.

Ejemplo 8. Investigación del efecto de la dalargina sobre la fagocitosis

50 La dalargina está actualmente autorizada para uso humano en el intervalo de dosis única de 1 a 5 mg [20], que, si se vuelve a calcular para ratones, corresponde a $\approx 0,2$ -1 mg/kg. Por lo tanto, la dosis usada para evaluar la eficacia del fármaco en células del exudado peritoneal fagocítico murino era de 0,2 mg/kg. De interés adicional era una investigación del posible efecto de la vía de administración del fármaco sobre la actividad funcional de los fagocitos.

La actividad inmunomoduladora del fármaco se evaluó mediante microscopía. La prueba se realizó en 60 ratones

macho BALB/c con un peso corporal de 18-22 g. Los animales se distribuyeron en 6 grupos iguales de 10 ratones cada uno. Dos grupos sirvieron como controles. Los grupos de terapia activa recibieron dalargina IM o por vía intranasal en una dosis única de 0,2 mg/kg. Los procedimientos de extracción de macrófagos y neutrófilos se realizaron al día siguiente de administrar los fármacos de estudio.

5 Se administró a los ratones una inyección intraperitoneal de 3-4 ml de solución de peptona al 10 % como quimioattractor para causar la acumulación de neutrófilos y, 2 horas después, los ratones se sacrificaron usando cloroformo 2 horas después. Posteriormente se les practicó la necropsia en condiciones asépticas. El líquido de la cavidad abdominal se extrajo usando una pipeta Pasteur, se colocó en tubos de ensayo y se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm. Luego, se resuspendió el precipitado para lograr concentraciones de neutrófilos de 2,5 millones/ml.

10 Con el fin de aislar los macrófagos, los ratones se sacrificaron el día 3 después de la inyección de peptona. Luego, se administraron por vía intraperitoneal 3-4 ml de medio 199 con 10% de suero fetal bovino y se aspiró el líquido.

Se añadieron bacterias *Staph. aureus* (de una cepa libre de proteína A) preopsonizadas con suero murino agrupado (10 min. a 37 °C) a un volumen igual de la suspensión de células fagocíticas a una relación de 10:1 (es decir, 25 millones/ml). Se preparó un frotis después de la incubación (tinción de Romanovsky-Giemsa).

15 La actividad fagocítica de los neutrófilos se evaluó mediante los siguientes parámetros: índice fagocítico y número de fagocitos. La actividad funcional de los macrófagos se evaluó mediante microscopía, así como su capacidad para absorber nitroazul de tetrazolio (NBT) en estado activado.

Los resultados demostraban que la dalargina (0,2 mg/kg) era capaz de aumentar la actividad fagocítica (fagocitosis) de neutrófilos movilizados por peptona en ratones. La vía de administración no tuvo ningún efecto sobre la eficacia.

20 La dalargina también mostraba un efecto estimulante sobre la fagocitosis de los macrófagos del exudado peritoneal, potenciando su capacidad para reducir el NBT. No se detectaron diferencias relacionadas con la vía de administración (Tabla 4).

Por lo tanto, la dalargina exhibía un efecto estimulante sobre el componente fagocítico de la inmunidad no específica.

Ejemplo 9. Evaluación del efecto de la dalargina sobre la producción de citocinas proinflamatorias.

25 El efecto de la dalargina sobre la síntesis de las citocinas IL-1 (interleucina-1), IL-6 (interleucina-6) y TNF- α (factor de necrosis tumoral α) se evaluó en un experimento in vitro usando un cultivo de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos (n = 20). Se usó la estimulación con un polisacárido enterobacteriano para inducir la producción de citocinas proinflamatorias.

30 Con el fin de obtener una suspensión de células mononucleares, se diluyó sangre a una relación 1: 2 con medio 199, se aplicó a un gradiente de densidad Ficoll-Paque, $d = 1,077 \text{ g/cm}^3$ y se centrifugó a 400 g durante 40 min. El anillo blanco producido en la interfase de fases, que contenía células mononucleares, se extrajo cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se lavó dos veces con medio 199 usando una centrifugación de 10 minutos (200 g). El precipitado se resuspendió en un medio nutritivo, se contó en una cámara de recuento Goryayev y se ajustó a la concentración requerida.

35 Se añadió dalargina a una concentración molar de $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ (0,036 $\mu\text{g/ml}$) a las muestras de prueba con el polisacárido y la suspensión de células mononucleares. El fármaco no se añadió a las muestras de control.

La cuantificación de citocinas en suero sanguíneo se realizó usando ELISA de dos sitios.

40 Los resultados presentados en la Fig. 3 demuestran una supresión significativa de la producción inducida por lipopolisacáridos de IL-6, IL-1 y TNF- α por la dalargina. El grado de producción de las citocinas proinflamatorias se presentó como una relación respecto a su concentración en las muestras de control, que se tomó como 100 %.

Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que el hexapéptido de prueba exhibe propiedades antivíricas e inmunomoduladoras. Regula la actividad de las células de inmunidad congénita y adaptativa. La dalargina potencia la actividad del componente fagocítico de la inmunidad (macrófagos y neutrófilos) y la actividad de las células citolíticas naturales. El producto también estimula la producción de interferones endógenos.

45 Además, la dalargina, al suprimir la hipersecreción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α), puede reducir la intoxicación y controlar otras manifestaciones de la cascada inflamatoria.

Por lo tanto, la composición farmacéutica demostraba actividad antivírica en un experimento en ratones que recibieron dalargina por vía intranasal a 2 mg/kg/día, lo que corresponde a una dosis humana de 10 mg diarios.

50 El volumen de solución para una sola administración intranasal en humanos es de 1 a 2 gotas por fosa nasal (para un total de 2 a 4 gotas), lo que corresponde a un volumen de 0,1 a 0,2 ml.

Las pruebas realizadas justifican la conclusión de que la concentración humana equivalente de la composición farmacéutica para administración intranasal es de 0,01-30 mg/ml (solución de dalargina al 0,01-3 %).

Cuando se administra por vía intranasal, la composición presenta efectos antivíricos e inmunomoduladores comparables a la administración intramuscular, lo que es especialmente relevante para la aplicación clínica.

Referencias

- 5 [1] Influenza and flu-like infections (including especially dangerous forms of influenza infections). Fundamental and applied aspects of investigation. Bulletin of the Task Committee. Eds.: V.I. Pokrovsky, D.K. Lvov, O.I. Kiselyov, F.I. Yershov. San Petersburgo, Roza mira, 2008.
- [2] Sullivan KM, Monto AS, Longini IM. Estimates of the US health impact of influenza. *AmlPublicHealth*, 1993, 83: 1712-1716.
- 10 [3] According to reports of the Federal State Healthcare Institution "Federal Centre for Hygiene and Epidemiology of Pospotrebnadzor of the Russian Federation. Disponible en: <http://www.fcgsen.ru/>.
- [4] Turner R. Epidemiology, pathogenesis and treatment of the common cold. *Annals of allergy, asthma and immunology*, 1997, 78: 531-539.
- [5] Hayden F, Couch R. Clinical and epidemiological importance of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Reviews in Medical Virology*, 1992, 2: 89-96.
- 15 [6] O.I. Kiselyov, E.G. Deyeva, T.V. Sologub, V.V. Tsvetkova. Recommendations for the Treatment and Prevention of Influenza in Adults. Instituto de Investigación de la Gripe del Ministerio de Salud de Rusia. San Petersburgo, 2014, 4.
- [7] E.P. Selkova. Current Problems of Symptomatic and Pathogenetic Treatment of Acute Respiratory Viral Infections. Reference Book of the Polyclinic Physician, 2013, 01: 9-13.
- 20 [8] E.P. Selkova. New Technologies in the Prevention and Treatment of Acute Respiratory Viral Infections. *Consilium Medicum Pediatriya*, 2007, 1: 66-68.
- [9] N.B. Lazareva, M.V. Zhuravlyova, L.R. Panteleyeva. ARVI: Rational Pharmacotherapy from the Standpoint of Clinical Pharmacology//*Meditsinsky Sovet*. - 2016. - N^o. 4.
- 25 [10] B.V. Balachevsky, A.N. Kurzanov, A.A. Slavinsky. Dalargin-induced Modulation of Functional-Metabolic Activity of Neutrophilic Leukocytes//*Uspekhi Sovremennogo Yestestvoznaniya*. - 2008. -N^o. 5.
- [11] A.N. Zokhirov y col. Effect of Dalargin, a Synthetic analogue of Opioid Peptides, on the Anti-oxidant Status of Dogs//*Vestnik Kurskoy Gosudarstvennoy Selskokhozyaystvennoy Akademii*. - 2016. -N^o. 9.
- [12] L.N. Maslov y col. Effects of D-Ala2, Leu5, Arg6-enkephalin (Dalargin) are Associated with the Activation of Peripheral Opioid μ -Receptors//*Eksperimentalnaya i Klinicheskaya Farmakologiya*. - 2008. - Vol. 71. – N^o. 2. - p. 21-28.
- 30 [13] Gabrilovac, J., Ilic-Sutlic, M., Knezevic, N. y Poljak, L. (1996). Leu-enkephalin enhances interferon secretion in mice. *Research in experimental medicine*, 196 (1), 137-144.
- [14] V.Yu. Cherdakov y col. Application of Regulatory Peptides: Timogen, Dalargin, Glycyl-histidyl-lysine and Combinations Thereof, for the Correction of the Neutrophilic Component of Anti-Infection Immunity in Femur Fractures//*Kursky Nauchno-Praktichesky Vestnik Chelovek*.
- 35 [15] M.A. Zemskov y col. Peculiarities of Immunological Disturbances and their Correction in Infections of Different Origin//*Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologiy*. -2011. - Vol. 18. -N^o. 3.
- [16] O.I. Chernyshyova, I.I. Bobyntsev. Biological effects of the GLY-HIS-LYS Peptide//*Mezhdunarodny Zhurnal Prikladnykh i Fundamentalnykh Issledovaniy*. - 2014. -N^o. 11-4. - p. 688-692.
- 40 [17] V.A. Zemskova, S.S. Zemskova, V.I. Domnich, V.I. Shabunina. Mechanisms of Action of Differentiated Immunotherapy of Suppurative-Inflammatory Diseases of Various Origin//*Prikladniye Informatsionniye Aspekty Meditsiny*. - 2009. - Vol. 12. – N^o. 2. - p. 71-77.
- [18] Guidelines on the Clinical Studies of Medicinal Products; Parte uno. Moscú. Grif i K, 2012. - 944 p.
- 45 [19] I.E. Makarenko y col. Possible routes and Volumes of Administration of Medicinal Products to Laboratory Animals//*Mezhdunarodny Vestnik Veterinari*. -2013. -N^o. 3. - p. 78-84.
- [20] F.I. Yershov, O.I. Kiselyov. Interferons and their Inductors (from Molecules to Drugs). Moscú, GEOTAR-Meida. - 2005. - 368 p.
- [21] V.P. Kuznetsov. Interferons in the Cytokine Cascade: Historical and Modern Aspects//*Antibiotiki i Khimioterapiya*.

1988. - Vol. 43. -Nº. 5. -C.28 - 40.

- [22] Instruction for use of the medicinal product for human use Dalargin-Deko (LP-004596, web portal of the State Registry of Medicinal Products <https://grls.rosminzdrav.ru/>, consultado el 31/01/2018).

REIVINDICACIONES

1. Una composición medicinal nasal que contiene el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina (dalargina) o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias agudas víricas (IRAV).
- 5 2. La composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 1, en la que la enfermedad es la gripe.
3. La composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 1, en la que la sal farmacéuticamente aceptable es diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina.
4. La composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 1, en la que la composición nasal se prepara en forma de pulverizador que contiene, como ingrediente activo, el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su forma farmacéuticamente aceptable en el porcentaje en peso del 0,01 % al 3 % y excipientes completando el resto.
- 10 5. La composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 4, en la que la composición contiene el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su sal y excipientes farmacéuticamente aceptables en la siguiente relación de ingredientes en % en masa: hexapéptido: 0,01-3 %, con agua completando el resto.
- 15 6. La composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 4, en la que la composición contiene el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su sal y excipientes farmacéuticamente aceptables en la siguiente relación de ingredientes en % en masa: hexapéptido: 0,01-3 %, cloruro de sodio 7-11 %, con agua completando el resto.
7. La composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 6, en la que la composición contiene el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su sal y excipientes farmacéuticamente aceptables en la siguiente relación de ingredientes en % en masa: hexapéptido: 0,01-3 %, cloruro de sodio 7-11 %, cloruro de benzalconio 0,1-0,2 %, con agua completando el resto.
- 20 8. Composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 1, en la que la composición contiene, como excipientes, cloruro de sodio y agua en la siguiente relación de componentes en % en masa: cloruro de sodio 9 %, agua 90 %.
- 25 9. Composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 5, en la que la composición contiene, como agua, agua para inyecciones o agua purificada.
10. Composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 6, en la que la composición contiene, como agua, agua para inyecciones o agua purificada.
- 30 11. Composición medicinal nasal para su según la reivindicación 7, en la que la composición contiene, como agua, agua para inyecciones o agua purificada.
12. Composición medicinal nasal para uso según la reivindicación 8, en la que la composición contiene, como agua, agua para inyecciones o agua purificada.

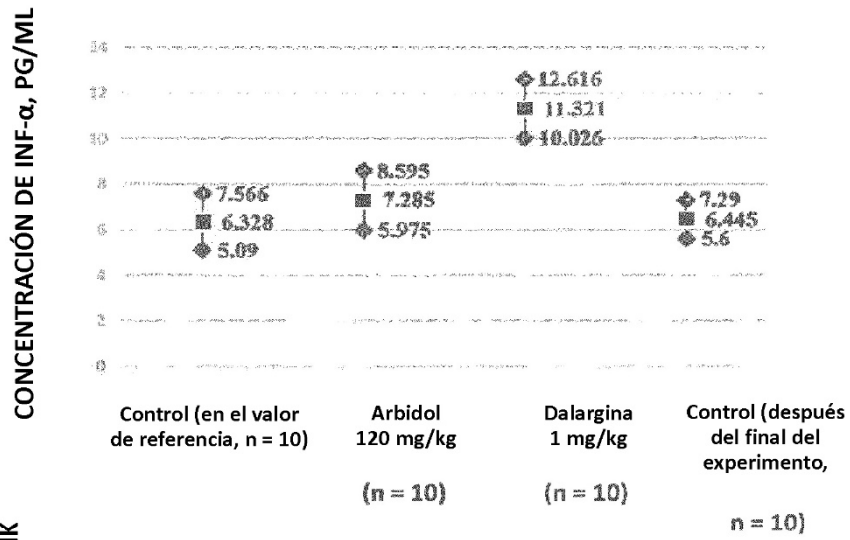


FIG. 1

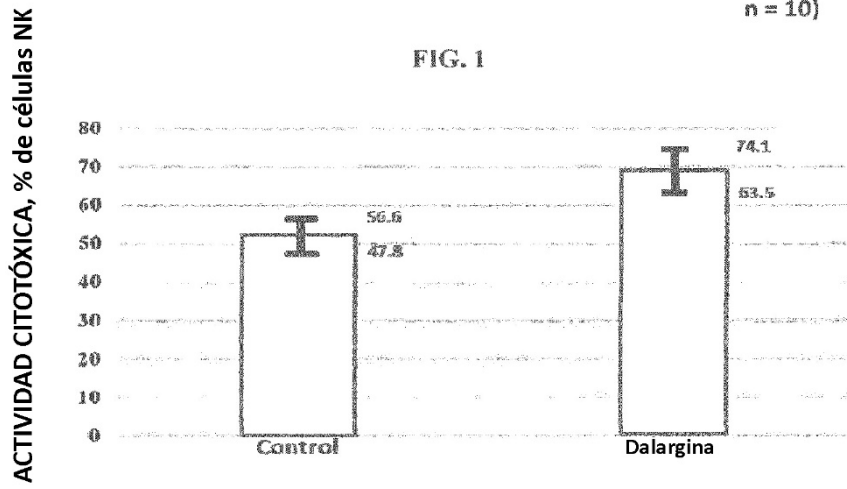


FIG. 2

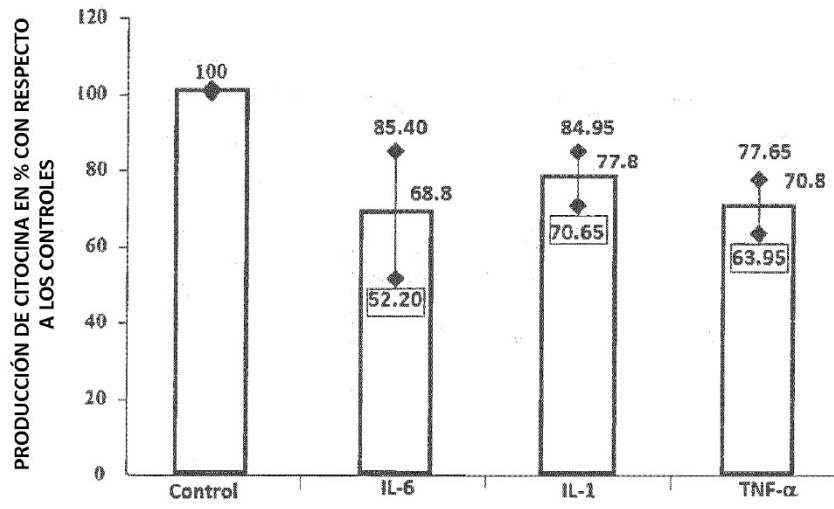


FIG. 3

Tabla 1

Tratamiento	Inhibición de la reproducción de virus	
	CMI50, µg/mL	Actividad a 10 µg/m (relación de células viables en %)
Arbidol	6.0	100
Dalargina	0.8	100

Tabla 2

Grupo	Tasa de supervivencia	Mortalidad %	Vida media
Dalargina (IM, 2 mg/kg/día, n = 10)	9/10	10	14.0
Dalargina (por vía intranasal, 2 mg/kg/día, n = 10)	8/10	20	12.5
Arbidol (por vía oral, 60 mg/kg/día, n = 10)	7/10	30	11.2
Control (placebo, n=10)	2/10	80	8.5

FIG. 4

Tabla 3

Régimen de dosificación	Dalargina (dosis, µg/ml)	Tasa de detección de ECP	Supresión de ECP (Ki, %)
24 horas antes de la exposición	100.0	1/10	90.0
	20.0	4/10	60.0
	10.0	6/10	40.0
2 horas después de la exposición	100.0	2/10	80.0
	20.0	5/10	50.0
	10.0	8/10	20.0
Control (sin tratamiento)	-	10/10	-
Control de medio	-	0/10	-

FIG. 5

Tabla 4

Neutrófilos		
Grupo	Índice fagocítico	Número de fagocitos
Control (n = 10),	19.1 ± 0.45	2.25 ± 0.10
Dalargina (IM, 0.2 mg/kg, n = 10)	32.43 ± 0.56*	3.01 ± 0.13*
Dalargina (por vía nasal, 0.2 mg/kg, n = 10)	31.87 ± 0.43*	2.93 ± 0.15*
Macrófagos		
Grupo	Índice fagocítico	Actividad fagocítica (%)
Control (n = 10)	55.2 ± 4.6	10.3 ± 0.7
Dalargina (IM, 0.2 mg/kg, n = 10)	67.7 ± 6.1*	19.8 ± 1.2*
Dalargina (por vía nasal, 0.2 mg/kg, n = 10)	63.9 ± 5.7*	19.1 ± 1.1*

Comentario: * = nivel de significancia $p < 0,05$ (respecto a los controles)

Fig.6