

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 265**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2012** **PCT/RU2012/001036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13141750**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012** **E 12871733 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017** **EP 2848629**

54 Título: **Péptidos sintéticos con un efecto analgésico de tipo no narcótico**

30 Prioridad:

22.03.2012 RU 2012110908

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2018

73 Titular/es:

KOTIN, OLEG ARKADYEVICH (100.0%)
ul. Koli Podrjadchikova 12 kv. 7 Leningradskaja
oblast
Gatchina 188300, RU

72 Inventor/es:

VLASOV, GENNADY PETROVICH y
KOTIN, ARKADIY MIHAJLOVICH

74 Agente/Representante:

EBRI SAMBEAT, Ana

ES 2 651 265 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

Péptidos sintéticos con un efecto analgésico de tipo no narcótico

5 Campo de la invención

La invención se refiere a la bioquímica, más particularmente, a péptidos biológicamente activos que tienen un tipo de acción analgésica no narcótica que pueden encontrar uso en medicina y farmacología como anodinas anestésicas.

Técnica anterior

Se conocen diferentes preparaciones anestésicas que se dividen en analgésicos narcóticos (morfina y estructuras congénitas) y no narcóticos (derivados de ácido salicílico, pirazolona, anilina, etc.) en cuando a su naturaleza química y modo de acción. Todos los analgésicos mencionados anteriormente tienen ciertas desventajas que reducen drásticamente las posibilidades de su aplicación en medicina (M. D. Mashkovsky. Medicinal products, Kharkov: editorial "Torsing", 1997, edición 13, págs.144-145).

Los analgésicos peptídicos conocidos son análogos sintéticos de encefalinas y endorfinas naturales, tales como péptidos opioides (Casy A.F., Parfitt A.C., Opioid analgesics: Chemistry and receptors. Nueva York, Plenum Press, 1986, 445-502; Lierz P., Stefan Punsmann S., 2008). Su principal desventaja es que la actividad anestésica va acompañada de habituación y acción narcótica. Además, los analgésicos narcóticos no son eficaces en todos los síndromes con dolor (Fallon M. When morphine does not work. Support Care Cancer. 15 de febrero de 2008).

También se conocen analgésicos peptídicos que tienen anestesia de tipo no narcótico y que no causan habituación y ni acción narcótica. Su acción anestésica se desarrolla a través de receptores no opioides y neurotransmisores. Las calcitoninas sintéticas y, más recientemente, las calcitoninas recombinantes, cuya acción anestésica se implementa a través de receptores de calcitonina específicos y el sistema serotoninérgico cerebral, han ganado la mayor difusión en ese grupo (Yasushi Kuraishi /Neuropeptide action of calcitonin-analgesic effect/ in Magazine Kidney and Metabolic Bone Disease, V. 14 No03). La más comúnmente usada es la secuencia sintética correspondiente a la calcitonina de salmón como la más activa entre todas las calcitoninas conocidas. La calcitonina de salmón es una hormona polipeptídica que consiste en 32 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 3.454,93 Dalton. Su estructura representa una hélice alfa (Andreotti G. et al, 2006).

La estructura primaria (secuencia de residuos de aminoácidos) de la calcitonina de salmón es como se indica a continuación:

40 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 bb
Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Glu-Lys-Leu-Ser-Gln-Asp-Leu-His-Lys-
19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
Leu-Gln-Thr-Phe-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ala-Gly-Val-Pro-NH₂

La calcitonina de salmón tiene una acción anestésica a largo plazo y actualmente existe en diferentes formas farmacéuticas: en forma de aerosol o gotas para uso intranasal, administración oral e intramuscular, así como en forma de supositorios.

50 Sin embargo, las calcitoninas de longitud completa tienen una diversidad de desventajas esenciales, incluyendo:

1) Actividad hormonal, impacto sobre el metabolismo del calcio y fosfórico. A este respecto, las calcitoninas no se pueden utilizar durante el embarazo y el alivio del dolor de parto debido a la posibilidad de efectos teratogénicos y efectos a largo plazo para la descendencia.
2) Actividad inmunológica. Por lo tanto, durante el uso prolongado de calcitonina, como es el caso en el tratamiento y prevención de la osteoporosis, se forman anticuerpos neutralizantes que reducen la eficacia del uso de calcitonina (Levy F et al., Formation of Neutralizing Antibodies During Intranasal Synthetic Salmon Calcitonin Treatment of Pagets Disease. 1988, 67, 3, 541-545).

- 3) Las calcitoninas de longitud completa contienen la secuencia amiloidogénica Gly2-Gln14 que es común para muchas proteínas amiloidogénicas (Steven S.-S. Wang¹, Theresa A. Good² y Dawn L. Rymer³).
- 4) El coste de la síntesis de calcitonina de longitud completa y el tratamiento con esta preparación es muy alto. Por esa razón, las calcitoninas se refieren a fármacos huérfanos que se usan solamente cuando no hay formas alternativas de tratamiento, por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Paget (Maresca V. Human calcitonin in the Management of osteoporosis: A multicenter Study.- J.Int.Med.Res., 1985, 13, 311-316).
- 10 Con el fin de eliminar las desventajas especificadas, se ha separado un fragmento de calcitonina de salmón que comprende 16-21 aminoácidos de calcitonina de salmón (en lo sucesivo en el presente documento denominado como *CT₁₆₋₂₁*) denominado el "centro activo" de la calcitonina (G. P. Vlasov, V. R. Glushenkova, A. M. Kotin et al. (1989) "Search of Active Centre of Calcitonin", Chemistry of Peptides and Proteins 4, 89):
- 15 16 17 18 19 20 21
 Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr

Se demostró que el fragmento natural de calcitonina de salmón, péptido *CT₁₆₋₂₁*, tiene una alta actividad analgésica en el ensayo de formalina en ratas que permite identificar el tipo de anestesia no narcótica, mientras que no tiene actividad inmunológica, impacto sobre el metabolismo del calcio y no contiene una secuencia amiloidogénica. La comparación con secuencias similares (16-21) de calcitoninas humanas, porcinas, bovinas y de rata reveló una mayor actividad en comparación con las últimas. (A. M. Kotin, G. P. Vlasov et al. (1988) "Search of "active centre" and comparative study of full-length calcitonin and sequence 16-21 of different calcitonins in various physiological tests. Abstracts of the "Peptide Physiology" symposium", Leningrad, 106).

- Andreev NA et al "Synthesis and Study of the Biological Activity of Salmon Calcitonin II" (publicado en 1993) describe los efectos analgésicos de varios péptidos derivados de Calcitonina de salmón II diferentes.
- 30 Patkina NA et al. "Studies of the analgesic activity of calcitonin fragments" (Pharm. Chem. J, vol. 28, N.º 10 1994) describen los efectos analgésicos de cinco fragmentos de calcitonina.

Rogachevskii IV et al. "Synthesis and Steric Structure of H-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-NH₂ and H-Ala-D-Ala-Lys-Leu-Ala-Thr-NH₂ Peptides" (Russian Journal of General Chemistry, Vol. 75 N.º 5, 2005) describen la conformación estructural de los péptidos de calcitonina.

Divulgación de la invención

El objeto de la presente invención es la extensión de una gama de fármacos eficaces que tienen un tipo de acción analgésica no narcótica y se obtienen por síntesis simple.

El objetivo establecido se resuelve en el sentido de que se sugieren péptidos sintéticos de fórmula general 1 [SEQ ID NO:1]:

45 H-XDL-XDL1-XDL2-L-Lys-L-Leu-XDL3 - L-Thr-R2 (I), donde:

H es hidrógeno,
XDL carece de aminoácido o L-Tyr,
XDL1 es uno de los siguientes aminoácidos: L-Leu, L-Ala o D-Ala,
50 XDL2 es uno de los siguientes aminoácidos: D-His, L-Ala o D-Ala,
XDL3 es uno de los siguientes aminoácidos: L-Gln;
R2 es OMe o NH₂,
o péptidos - retroinversiones de la fórmula (I) que tienen secuencia inversa de aminoácidos con reemplazo de la forma L de aminoácidos con forma D, y de la forma D de aminoácidos con forma L en la fórmula general 2 [SEQID NO:2]

55

H- D-Thr -XDL4- D-Leu - D- Lys - XDL5- XDL6 - XDL7 -R2 (II), donde:

H es hidrógeno,

XDL4 es uno de los siguientes aminoácidos: D-Gln;
 XDL5 es uno de los siguientes aminoácidos: L-His, D-Ala o L-Ala,
 XDL6 es uno de los siguientes aminoácidos: D-Leu, D-Ala o L-Ala,
 XDL7 carece de aminoácido o D-Tyr,
 R2 es OMe o NH₂,

5

como preparaciones anestésicas con una acción analgésica de tipo no narcótico.

Los péptidos sugeridos tienen acción anestésica, incluyendo tras una inyección sistémica y administración intranasal.

10

La esencia de la invención es que se estableció mediante un experimento en cuando a que los péptidos reivindicados que tienen la estructura sencilla que simplifica su obtención por medios químicos poseen una alta actividad anestésica verificada mediante ensayos analgésicos realizados en animales.

15

Algunos péptidos de la fórmula general I, II se presentan en la tabla 1:

Tabla 1. Algunas secuencias de aminoácidos para los péptidos reivindicados correspondientes a la fórmula general I o II.

20

SEQ ID NO:1							
H-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	OMe
H-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr-	NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- OMe
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- OMe
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- NH ₂
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- OMe
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-His-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- OMe
H-	L-Tyr-	L-Leu-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- OMe
H-	L-Tyr-	L-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- NH ₂
H-	L-Tyr-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- OMe
H-	L-Tyr-	D-Ala-	L-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- OMe
H-	L-Tyr-	L-Leu-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- NH ₂
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- OMe
H-	L-Tyr-	L-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- NH ₂
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- OMe
H-	L-Tyr-	D-Ala-	D-Ala-	L-Lys-	L-Leu-	L-Gln-	L-Thr- NH ₂

SEQ ID NO:2								
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	OMe	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	NH ₂	
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Leu-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	D-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-His-	L-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	D-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Leu-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	D-Ala-	D-Tyr-	NH ₂
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	OMe
H-	D-Thr-	D-Gln-	D-Leu-	D-Lys-	L-Ala-	L-Ala-	D-Tyr-	NH ₂

Todos los péptidos de esta familia tienen actividad analgésica.

Realizaciones de la invención.

5

La síntesis de los péptidos de la fórmula I se realizó mediante métodos de química de péptidos, método de síntesis en fase sólida con uso de L o D-aminoácidos.

Ejemplo 1. Síntesis del péptido H-Tyr-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr- NH₂

10

El péptido H-Tyr-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr- NH₂ se obtuvo por el método de síntesis en fase sólida automática de acuerdo con el esquema Fmoc en resina de Rink (Resina de amida de Rink, 0,6 mmol de grupos amino) por 1 g de resina) con el uso del método de activación de aminoácidos de DCC/HOBt (N, N'-diciclohexilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol).

15

La liberación se realizó a modo de tratamiento con solución de piperidina/DMF (piperidina/K, K-dimetilformamida) (1:4) durante 7 minutos. La protección de grupos de cadenas laterales se realizó con los siguientes grupos: tBu (terc-butil éter) para tirosina y treonina, Trt (tritilo o trifenilmetilo) para glutamina e histidina, Boc (t-butiloxycarbonilo) para lisina. Los péptidos se escindieron de la resina y se liberaron con la

20

mezcla TFA/H₂O/EDT (ácido trifluoroacético/agua/1,2-etanditiol) (90:5:5). La depuración de los péptidos se

realizó por medio de HPLC de fase inversa (columna C18), eluyente - acetonitrilo - agua (dihidrogenofosfato potásico 0,1 M) en una proporción de 6:4. Los péptidos se caracterizaron con la ayuda de un espectrómetro de masas.

- 5 Se realizó el reemplazo de aminoácidos en ciertas posiciones del péptido **CT₁₆₋₂₁**, y se reveló cómo afecta a las propiedades anestésicas de los péptidos obtenidos. La actividad analgésica de los péptidos recién sintetizados se examinó en el "ensayo de formalina" que permite descubrir el tipo de anestesia no narcótica (Wheeler - Aceto H., Porrea F., A.Cowan. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. Pain, 40 (1990), 229-238).

10

Ejemplo 2. Examen de actividad analgésica de péptidos recién sintetizados.

- La actividad analgésica de péptidos recién sintetizados se examinó como se indica a continuación. Se inyectó por vía suboccipital a ratas que pesaban 180-200 g el péptido de estudio bajo anestesia con éter usando un microdispensador en 10 µl de solución salina normal. Los animales de control se inyectaron de manera similar con la misma cantidad de solución salina normal. Después de 20 minutos, se inyectaron 50 mcl de solución de formalina a una dilución de 1:50 en la superficie dorsal de la pata trasera derecha. El tiempo de inyección de péptido y dilución de formalina se ha desarrollado antes. Cada rata se usó solamente una vez. Los indicadores conductuales más claros de la reacción al dolor se expresaron en el plegado de la pata, lametones, mordisqueos y sacudidas. Además, la primera reacción aguda al dolor que duró 6-7 min en animales de control fue seguida del período de latencia: una rata bajó su pata, se detuvo el comportamiento de aseo y mordisqueo. Luego, la reacción se repitió con una expresión no inferior a la anterior: era la segunda fase de la reacción al dolor.

- 25 El momento del pliegue de la pata (comienzo de la primera fase de la reacción al dolor), la duración de esta reacción, la duración de la latencia y el tiempo de inicio de la segunda fase de la reacción - pliegue repetido de la pata o su ausencia- se registraron visualmente con el fin de obtener datos cuantitativos. El péptido se inyectó 20 minutos antes de la inyección de formalina en el caso de un método suboccipital de inyección de péptido, y 30 minutos antes de la inyección de formalina en el caso del método intranasal.
- 30 I. La "detección de L-alanina" se realizó cuando los aminoácidos naturales en diferentes posiciones del péptido **CT₁₆₋₂₁** se reemplazaron sucesivamente con aminoácidos "simples" de L-alanina, y se investigó cómo esto afecta a la actividad analgésica peptídica. La actividad de 10 péptidos sintéticos sintetizados de acuerdo con el Ejemplo 1 se comparó tanto con el control (solución salina normal) como con **CT₁₆₋₂₁** según la técnica descrita en el Ejemplo 2. Los resultados se dan en las tablas 2 y 3, donde Ala-16, Ala-17, Ala-18, etc. son péptidos similares a **CT₁₆₋₂₁**, en donde la alanina está en la posición correspondiente.

Tabla 2. Actividad analgésica de los péptidos cuando se reemplazan aminoácidos en diferentes posiciones con L-alanina (ratas, inyección suboccipital).

PÉPTIDO	Dosis µg/rata	Número de ratas	Tiempo de inicio de la reacción al dolor (s)	Duración del primer pico de reacción al dolor (s)
Control	-	62*	6 (2)	435 (13)
CT ₁₆₋₂₁	0,001	10	17 (6)	394 (34)
CT ₁₆₋₂₁	0,01	11	19 (8)	328 (21)
CT ₁₆₋₂₁	0,1	22	39 (8) $\alpha < 0,001$	263 (20) $\alpha < 0,001$
Ala-16	0,001	18	10 (2)	426 (28)
Ala-16	0,01	9	38 (11) $\alpha < 0,01$	323 (42) $\alpha < 0,02$
Ala-16	0,1	9	52 (14)	299 (39)
			$\alpha < 0,002$	$\alpha < 0,002$
Ala-17	0,001	8	6 (4)	388 (40)
Ala-17	0,01	14	60 (17) $\alpha < 0,05$	282 (43) $\alpha < 0,05$
Ala-17	0,1	10	70 (20) $\alpha < 0,002$	300 (21) $\alpha < 0,002$
Ala-18	0,1	9	39 (15) $\alpha < 0,1$	374 (32) $\alpha < 0,1$
Ala-19	0,1	14	25 (10) $\alpha < 0,1$	294 (26) $\alpha < 0,1$
Ala-20	0,001	13	12 (4) $\alpha < 0,1$	378 (26) $\alpha < 0,1$
Ala-20	0,01	8	46 (13)	338 (56)
			$\alpha < 0,1$	$\alpha < 0,1$
Ala-20	0,1	9	43 (18)	206 (43)

			$\alpha < 0,001$	$\alpha < 0,001$
Ala-21	0,1	7	7 (2)	272 (27) $\alpha < 0,02$

Tabla 3. Comparación de la actividad analgésica de los péptidos a una dosis de 1 µg por rata

Péptido	Número de ratas	Comienzo de la reacción al dolor	Duración del 1 ^{er} pico (s)	Comienzo del 2 ^o pico (min)	Número de animales que no tienen el 2 ^o pico de reacción
Control	62*	5 ± 2	435 ± 13	18 ± 3	1
CT ₁₆₋₂₁	28	30 ± 6 $\alpha < 0,001$	284 ± 20 $\alpha < 0,001$	21 ± 2 (n = 24)	4
L-Ala-16	10	80 ± 22 $\alpha < 0,002$	264 ± 41 $\alpha < 0,001$	21 ± 2 (n = 9)	1
L-Ala-17	9	75 ± 15 $\alpha < 0,001$	217 ± 21 $\alpha < 0,001$	21 ± 4 (n = 6)	3
L-Ala-18	9	44 ± 18 $\alpha < 0,05$	274 ± 46 $\alpha < 0,002$	19 ± 2 (n = 5)	4
L-Ala-19	10	13 ± 5 $\alpha < 0,05$	330 ± 38 $\alpha < 0,02$	18 ± 2 (n = 7)	3
L-Ala-20	10	56 ± 20 $\alpha < 0,02$	226 ± 31 $\alpha < 0,001$	16 ± 20 (n = 7)	3
L-Ala-21	12	24 ± 9 $\alpha < 0,05$	265 ± 26 $\alpha < 0,001$	16 ± 2 (n = 11)	1

- 5 Como puede verse en las tablas 2, 3, el reemplazo de aminoácidos en la posición 18 y particularmente 19 y 21 con L-alanina va acompañado de cierta caída de la actividad peptídica. El comienzo de la reacción al dolor a una dosis tan baja como 0,1 µg por rata no difiere de la del control de forma fiablemente. Sin embargo, la duración de la reacción al dolor fue menor que en las ratas de control a la dosis de 1 µg tras el reemplazo por
- 10 L-alanina en la posición 19 y a la dosis de 0,1 µg en caso de reemplazos en las posiciones peptídicas 19 y 20. Además, pareció que la prevención del segundo pico de la reacción al dolor se observa en proporciones iguales tanto en el péptido inicial como en el caso de reemplazos con alanina en las posiciones 18, 19 y 21. Esto apunta a la falta de equivalencia de los mecanismos del primer y segundo picos de reacción al dolor y el impacto del reemplazo de aminoácidos en el péptido en los mismos.
- 15 Por el contrario, el reemplazo de aminoácidos en las posiciones 16, 17 y 20 con L-alanina no tuvo un impacto esencial sobre la actividad analgésica peptídica, y en algunos casos (por ejemplo, al reemplazar histidina con alanina en la posición 17), la actividad fue incluso más alta en cierta medida, tanto de acuerdo con el criterio de retraso de inicio de la reacción al dolor, así como su criterio de duración. Esto muestra la posibilidad de reemplazar el aminoácido histidina "complejo" y costoso con la alanina "simple" y barata sin pérdida de
- 20 actividad. También se reveló la tendencia del aumento del número relativo de animales que no tienen el segundo pico de reacción en el caso del reemplazo de aminoácidos naturales con L-alanina en las posiciones 17 y 20.
- Las principales conclusiones que pueden extraerse de los datos presentados en las tablas 2 y 3 son como se indican a continuación:

- 25
1. El reemplazo de aminoácidos en las posiciones 18, 19 y 21 de la calcitonina de salmón con L-alanina conduce a la pérdida de actividad esencial del péptido inicial.
 2. El reemplazo de aminoácidos en las posiciones 16, 17 y 20 con L-alanina no afecta esencialmente a la actividad peptídica inicial.
 3. La clara tendencia del aumento de la actividad peptídica se observa en caso de reemplazo de
- 30 histidina por alanina en la posición del fragmento 17.

- II. La "detección de D-alanina" también se realizó cuando los aminoácidos naturales en diferentes posiciones del péptido CT₁₆₋₂₁ se reemplazaron sucesivamente con el aminoácido "simple" D-alanina, y se investigó
- 35 cómo afecta a la actividad analgésica peptídica. La actividad de los péptidos sintéticos sintetizados de acuerdo con el Ejemplo 1 que tienen reemplazo de D-alanina en la posición correspondiente se comparó tanto con el control (solución salina normal) como con CT₁₆₋₂₁ según la técnica del Ejemplo 2. Los resultados se dan en la tabla 4.

Tabla 4. Actividad analgésica de los péptidos cuando se reemplazan aminoácidos en diferentes posiciones con D-alanina.

Péptido	Número de ratas	Comienzo de la reacción al dolor (s)	Duración del 1 ^{er} pico de reacción al dolor	Comienzo del 2 ^o pico (min)	Número de ratas que no tienen el 2 ^o pico
Control	13	4 (2)	417(15)	11 (2)	-
16-D-Ala 1 µg	10	52 (9) $\alpha < 0,001$	333 (15) $\alpha < 0,002$	16 (2)	2
17-D-Ala 16,20-L-Ala 1 µg	16	40 (7) $\alpha < 0,001$	217 (15) $\alpha < 0,001$	18 (2)	2
17-D-Ala 16,20-L-Ala 0,1 µg	8	11(4) $\alpha < 0,1$	300 (30) $\alpha < 0,01$	13 (1)	-
18-D-Ala 1 µg	9	32 (8) $\alpha < 0,01$	380(15) $\alpha < 0,002$	15 (2)	2
19-D-Ala 1 µg	7	68(17) $\alpha < 0,002$	337 (46) $\alpha < 0,01$	24(2) $\alpha < 0,001$	4
20 D-Ala 1 µg	10	27(6) $\alpha < 0,002$	268 (27) $\alpha < 0,001$	15 (2) $\alpha < 0,01$	-
21 D-Ala 1 µg	11	27(7) $\alpha < 0,01$	345 (34) $\alpha < 0,1$	15 (2) $\alpha = 0,02$	1 - sin reacción al dolor
CGRP 1 µg	5	5 (2)	402 (36)	17(2)	-

- 5 Analizando los datos presentados en la tabla 4, se puede observar que el reemplazo de aminoácidos en **CT₁₆₋₂₁** con D-alanina no condujo a un aumento de la actividad analgésica en oposición a la actividad de **CT₁₆₋₂₁** inicial. En este sentido, la actividad analgésica se conserva hasta cierto punto en todas las variantes de reemplazo. Sin embargo, esta reacción es altamente específica, porque, por ejemplo, un fragmento de péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) no tiene actividad analgésica en este ensayo en absoluto. El reemplazo del éter metílico del fragmento 16-21 con derivado de dimetilhidrazida también priva al fragmento del péptido **CT₁₆₋₂₁** de la posibilidad de producir acción anestésica.
- 10 El mayor grado de fiabilidad de las diferencias con respecto al control de los tres parámetros que caracterizan la acción analgésica se observó durante los reemplazos del aminoácido en la posición 17 con D-Ala, y los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 con L-Ala. En esta variante, varios animales no tuvieron el segundo
- 15 pico de reacción, aunque la actividad no alcanzó los valores observados en caso de reemplazo del aminoácido natural en la posición 17 con D-histidina. Sin embargo, ésta última es una forma más costosa de péptido analgésico. Las principales conclusiones que pueden extraerse de los datos presentados en la tabla 4 son como se indican a continuación:
- 20 4. El reemplazo de aminoácidos naturales en **CT₁₆₋₂₁** con D-alanina no conduce a un cambio de actividad esencial en oposición a la secuencia natural.
5. El péptido con reemplazos en la posición 17 con D-Ala y en las posiciones 16 y 20 con L-Ala es el compuesto más activo.
- 25 **III.** Se estableció una posibilidad de aumento de la estabilidad de los péptidos obtenidos (duración de la acción) por medio del reemplazo del L-aminoácido natural con el D-aminoácido correspondiente con el fin de reducir la tasa de escisión enzimática potencial del péptido. La actividad de los péptidos sintéticos sintetizados de acuerdo con el Ejemplo 1 se comparó tanto con el control (solución salina normal) como con el fragmento peptídico natural **CT₁₆₋₂₁** según la técnica descrita en el Ejemplo 2. Los resultados se dan en la
- 30 tabla 5.

Tabla 5. Actividad analgésica de los péptidos con reemplazo de L-aminoácidos con D-aminoácidos correspondientes en diferentes posiciones correspondientes a su número.

Péptido	Número de ratas	Comienzo de la reacción al dolor (s)	Duración del 1 ^{er} pico de reacción al dolor	Comienzo del 2 ^o pico (min)	Número de ratas que no tienen el 2 ^o pico
---------	-----------------	--------------------------------------	--	--	--

Control (solución salina normal)	22	6 (2)	484 (17)	17 (8)	-
16 D-Leu 1 µg	7	3 (1)	449 (24)	17 (2)	
			1 - ninguna		
			1 - paralizado		
17-D-His 1 µg	15	56 (17)	296 (41)	18 (2)	7
		$\alpha < 0,01$	$\alpha < 0,001$	n = 8	
17-D-His 0,1 µg	7	48 (14)	236 (21)		7
		$\alpha < 0,001$	$\alpha < 0,001$		
18-D-Lys 1 µg	10	91 (30)	303 (25)	18 (2)	1
		$\alpha < 0,001$	$\alpha < 0,001$		
19-D-Leu 1 µg		327 (33)	21 (2)	1	
		$\alpha < 0,001$			
20-D-Gln 1 µg	9	20 (16)	372 (23)	18 (2)	
			$\alpha < 0,001$		

En base a los datos presentados en la tabla 5, puede observarse que las principales diferencias con respecto a la actividad analgésica del péptido de control **CT₁₆₋₂₁** se logran en caso de reemplazo del aminoácido natural L-histidina en la posición 17 con D-histidina: En este caso, casi la mitad de los animales no tienen el segundo pico de reacción al dolor y, lo cual es muy importante, dicha respuesta se conserva al reducir la dosis 10 veces. La duración más corta del primer pico de reacción al dolor se observó en el mismo caso. Entre los reemplazos desfavorables, se debe observar el reemplazo de L-leucina con D-leucina en la posición 16, que provocó reacciones secundarias no deseadas - parálisis de un animal. Las principales conclusiones que pueden extraerse de los datos presentados en la tabla 5 son como se indican a continuación:

6. El reemplazo de L-aminoácidos naturales en **CT₁₆₋₂₁** con D-aminoácidos correspondientes no condujo a un aumento de la actividad esencial, excepto el reemplazo de L-histidina con D-histidina en la posición 17. En este caso, la actividad ha aumentado sustancialmente, mientras que la mitad de los animales no tuvieron el segundo pico de reacción al dolor.

IV. También se estableció la posibilidad del aumento de la estabilidad de 10 péptidos obtenidos por medio de la modificación de la secuencia terminal peptídica. La actividad de los péptidos sintéticos sintetizados de acuerdo con el Ejemplo 1 se comparó tanto con el control (solución salina normal) como con **CT₁₆₋₂₁** según la técnica descrita en el Ejemplo 2. Los resultados se dan en la tabla 6.

Tabla 6. Evaluación de la actividad analgésica de los péptidos modificados con éter metílico o hidrazida en el aminoácido terminal.

N.º	Péptidos	Dosis (µg)	Número de ratas	Retraso del inicio de la reacción al dolor (s)	Disminución de la duración de la 1ª fase	% de ratas	
						Sin la 1ª fase de reacción al dolor	Sin la 2ª fase
1	CT _{16-21H}	1	10	91 ± 12	158 ± 26		25
				$\alpha < 0,01$	$\alpha < 0,001$		
		0,1	8	72 ± 14	110 ± 12		
				$\alpha < 0,05$	$\alpha < 0,01$		
2	CT _{16-21H}	0,01	4	20 ± 8	20 ± 4		
		10	11	19 ± 3	143 ± 21		
				$\alpha < 0,01$	$\alpha < 0,01$		
		1	13	17 ± 3	153 ± 12		
				$\alpha < 0,01$	$\alpha < 0,01$		
		0,1	14	7 ± 2	145 ± 12		14
3	CT ₁₆₋			$\alpha < 0,05$	$\alpha < 0,01$		
		0,01	10	4 ± 3	110 ± 17		
		10	16	27 ± 11	167 ± 25	18	25

	21OMe			$\alpha < 0,01$	$\alpha < 0,001$		
		1	35	22 ± 5	163 ± 20	5	48
				$\alpha < 0,01$	$\alpha < 0,001$		
		0,1	21	21 ± 8	167 ± 15	33	10
				$\alpha < 0,01$	$\alpha < 0,001$		
		0,01	19	14 ± 4	150 ± 20		
				$\alpha < 0,1$	$\alpha < 0,01$		
		10	10	87 ± 23	185 ± 18		14
				$\alpha < 0,01$	$\alpha < 0,001$		
4	CT ₁₆₋₂₁ NH ₂	1	19	91 ± 13	208 ± 28	26	42
				$\alpha < 0,02$	$\alpha < 0,001$		
		0,1	8	60 ± 9	182 ± 23	12	33
				$\alpha < 0,01$	$\alpha < 0,001$		
		0,001	6	25 ± 8	37 ± 12	17	

De acuerdo con los datos proporcionados, las secuencias (péptidos) modificadas terminalmente con éter metílico y específicamente hidrazida, fueron las más activas. Las principales conclusiones que pueden extraerse de los datos presentados en la tabla 5 son como se indican a continuación:

5

6. Es posible aumentar la estabilidad de los péptidos sin pérdida de su actividad por medio de una modificación terminal con éter metílico o hidrazida.

V. También se investigaron los péptidos - retroinversiones de la fórmula I correspondientes a la fórmula II que tienen una secuencia inversa de aminoácidos con el reemplazo de las formas L de aminoácidos con las formas D, y las formas D de aminoácidos con las formas L. Dichos péptidos se distinguen por su alta resistencia a todo tipo de peptidasas (Mariotti et al., Patente Europea EP0393786). Particularmente, se investigaron las secuencias D-Thr- D- Gln- D-Leu- D-Lys- D-His- D-Leu-NH₂ (retroinversión CT₁₆₋₂₁) y D-Thr- D-Gln- D-Leu- D- 15 Lys- L-His- D-Leu- NH₂ (retroinversión CT₁₆₋₂₁ con reemplazo de L-histidina en la posición 17 con D-histidina). La actividad de los péptidos sintéticos sintetizados de acuerdo con el Ejemplo 1 se comparó tanto con el control (solución salina normal) como con CT₁₆₋₂₁ según la técnica descrita en el Ejemplo 2. Los resultados se dan en la tabla 7.

Tabla 7. Actividad analgésica de la secuencia CT₁₆₋₂₁ con el reemplazo de L-histidina en la posición 17 con D-histidina, retroinversión de esta secuencia y retroinversión de CT₁₆₋₂₁ en el caso de un método de administración intranasal en tampón citrato fosfato. El péptido se inyectó 30 minutos antes de la inyección subcutánea de formalina al 2 %.

20

N.º	Experimento	Número de ratas	Dosis (µg)	Comienzo de la reacción al dolor (s)	Duración del 1º pico de reacción al dolor	Comienzo del 2º pico (min)
1	Control (tampón citrato fosfato)	6		8 ± 1	341 ± 23	$15,5 \pm 1,5$
		7	10	35 ± 10	228 ± 13	$21,2 \pm 1,1$
2	17 D-His			$\alpha < 0,05$	$\alpha < 0,002$	$\alpha < 0,02$
		5	1	44 ± 37	410 ± 54	ninguno de los dos tiene el 2º pico 20,5 3,5
3	Retroinversión completa CT ₁₆₋₂₁	4	10	20 ± 9	333 ± 9	$14,4 \pm 1,0$
		5	1	12 ± 46	300 ± 46	$17,4 \pm 2,9$
		6	0,1	12 ± 20	249 ± 20	$16,2 \pm 2,6$
					$\alpha < 0,02$	
4	17 L-His- tras la retroinversión completa de CT ₁₆₋₂₁	5	10	8 ± 3	314 ± 32	$15,0 \pm 1,6$
		6	1	10 ± 2	342 ± 26	$12,5 \pm 1,6$, el primero no tiene ninguno
		3	0,1	48 ± 18 $\alpha < 0,1$	300 ± 10	$21,0 \pm 5,3$

De acuerdo con los datos proporcionados, es posible usar péptidos - retroinversiones de la fórmula (I) para la

25

analgesia.

Las principales conclusiones que pueden extraerse de los datos presentados en la tabla 7 son como se indican a continuación:

- 5 7. Los péptidos - retroinversiones de la fórmula (II) que tienen una secuencia inversa de aminoácidos con reemplazo de formas L de aminoácidos con formas D y formas D de aminoácidos con formas L, poseen una alta actividad analgésica.

- 10 VI. Los péptidos con la adición de la secuencia de aminoácidos L-Tyr ausente en el fragmento natural de calcitonina en el extremo N se sintetizaron de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1. La actividad de los péptidos sintéticos sintetizados se comparó tanto con el control (solución salina normal) como con **CT₁₆₋₂₁** según la técnica descrita en el Ejemplo 2. Los resultados se dan en la tabla 8.

Tabla 8. Actividad analgésica de la secuencia Tyr-16-21OMe.

15

Experimento	Dosis μ g	Número de ratas	Retraso del inicio de la reacción al dolor	Disminución de la duración del primer pico de reacción al dolor	% de animales sin reacción al dolor	% de animales sin el segundo pico de reacción al dolor
Tyr-16-21OMe	10	4	27 $\pm$ 10	155 $\pm$ 35 a < 0,001		100
	1	11	30 $\pm$ 15	134 $\pm$ 50 a < 0,05		60

De acuerdo con los datos proporcionados, los péptidos obtenidos son eficaces en la prevención del segundo pico de la reacción al dolor.

20 Aplicabilidad industrial

- Por lo tanto, los ejemplos dados anteriormente demuestran la posibilidad de producir los péptidos sugeridos que tienen una alta actividad analgésica. Además, los péptidos con la adición de la secuencia de aminoácidos L-Tyr ausente en el fragmento natural de calcitonina en el extremo N-terminal, son más eficaces en la prevención del segundo pico de reacción al dolor. El resultado técnico de la presente invención es una alta actividad analgésica y la resistencia de los péptidos sugeridos, lo que permite considerarlos como la base para la creación de fármacos analgésicos medicinales seguros con una acción analgésica de tipo no narcótico.

30 Lista de secuencias

- <110> KOTIN Arkadij Mihajlovich
- <120> Péptidos sintéticos con acción analgésica de tipo no narcótico
- 35 <130> RU 2012110908
- <160> SEQ ID NO
- 40 <210> 1
<211> 6
<212> Péptido
<213> Secuencia artificial
- 45 <400> 1
Ala His Lys Leu Gln Thr
- <210> 1
<211> 6
- 50 <212> Variación peptídica
<213> Secuencia artificial
- <400> 2 Leu Ala Lys Leu Gln Thr

5	<210> 1 <211> 6 <212> Variación peptídica <213> Secuencia artificial <400> 3 Ala Ala Lys Leu Gln Thr
10	<210> 1 <211> 6 <212> Variación peptídica <213> Secuencia artificial
15	<400> 4 Leu Ala Lys Leu Ala Thr
20	<210> 1 <211> 6 <212> Variación peptídica <213> Secuencia artificial
25	<400> 5 Ala Ala Lys Leu Ala Thr
30	<210> 1 <211> 7 <212> Variación peptídica <213> Secuencia artificial <400> 6 Tyr Leu His Lys Leu Gln Thr
35	<210> 1 <211> 7 <212> Variación peptídica <213> Secuencia artificial
40	<400> 7 Tyr Leu Ala Lys Leu Gln Thr
45	<210> 1 <211> 7 <212> Variación peptídica <213> Secuencia artificial
50	<400> 8 Tyr Ala Ala Lys Leu Gln Thr
55	<210> 1 <211> 7 <212> Variación peptídica <213> Secuencia artificial <400> 9 Tyr Leu His Lys Leu Ala Thr <210> 1 <211> 7 <212> Variación peptídica

	<213> Secuencia artificial
	<400> 10
5	Tyr Ala His Lys Leu Ala Thr
	<210> 1
	<211> 7
	<212> Variación peptídica
10	<213> Secuencia artificial
	<400> 11
	Tyr Leu Ala Lys Leu Ala Thr
	<210> 1
15	<211> 6
	<212> Variación peptídica
	<213> Secuencia artificial
	<400> 12
20	Leu -His-Lys-Leu-Gln-Thr

REIVINDICACIONES

1. Péptidos sintéticos de la fórmula general 1 [SEQ ID NO:1]
5 H- XDL-XDL1- XDL2 - L- Lys - L-Leu - XDL3 - L-Thr -R2 (I), donde:

H es hidrógeno,
XDL carece de aminoácido o L-Tyr,
XDL1 es uno de los siguientes aminoácidos: L-Leu, L-Ala o D-Ala,
10 XDL2 es uno de los siguientes aminoácidos: D-His, L-Ala o D-Ala,
XDL3 es uno de los siguientes aminoácidos: L-Gln;
R2 es OMe o NH₂,
o péptidos - retroinversiones de la fórmula (I) que tienen secuencia inversa de aminoácidos con
reemplazo de la forma L de aminoácidos con forma D, y de la forma D de aminoácidos con forma L
15 en la fórmula general 2 [SEQ ID NO:2]
H- D-Thr -XDL4- D-Leu - D- Lys - XDL5- XDL6 - XDL7 -R2 (II), donde:

H es hidrógeno,
XDL4 es uno de los siguientes aminoácidos: D-Gln;
20 XDL5 es uno de los siguientes aminoácidos: L-His, D-Ala o L-Ala,
XDL6 es uno de los siguientes aminoácidos: D-Leu, D-Ala o L-Ala,
XDL7 carece de aminoácido o D-Tyr,
R2 es OMe o NH₂,
como preparaciones anestésicas con una acción analgésica de tipo no narcótico.
25
2. Los péptidos sintéticos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que

XDL1 es L-Leu;
XDL2 es D-His;
30 XDL3 es L-Gln;
XDL4 es D-Gln;
XDL5 es L-His; y
XDL6 es D-Leu.