

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 005 857**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01)

A61P 29/02 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2021** **PCT/FR2021/051694**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2022** **WO22074313**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2021** **E 21798748 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024** **EP 4225295**

54 Título: **Nuevos peptoides y su uso en la prevención o el tratamiento del dolor crónico**

30 Prioridad:

06.10.2020 FR 2010186

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2025

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE (20.00%)
49 Boulevard François Mitterand
63000 Clermont-Ferrand, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (20.00%);
SIGMA CLERMONT (20.00%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.00%) y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (20.00%)

72 Inventor/es:

BUSSEROLLES, JÉRÔME;
BOURINET, EMMANUEL;
TAILLEFUMIER, CLAUDE;
ROY, OLIVIER;
NAUTON, LIONEL y
AISSOUNI, YOUSSEF

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 005 857 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

Nuevos peptoides y su uso en la prevención o el tratamiento del dolor crónico

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere a nuevas moléculas peptidomiméticas (o peptoides, también denominados híbridos péptido-peptoide o peptómeros) para la prevención y/o el tratamiento del dolor crónico, en particular el resultante de neuropatías periféricas (p. ej., inducidas por quimioterapia).

10 En la siguiente descripción, las referencias entre corchetes ([]) se refieren a la lista de referencias al final del texto.

Estado de la técnica

15 El dolor crónico afecta a 1.500 millones de personas en todo el mundo, para quienes la respuesta terapéutica es claramente insuficiente (Finnerup NB y col., 2015) [1]. Estudios epidemiológicos recientes han estimado que el dolor crónico afecta aproximadamente al 20 % de los adultos y al 50 % de las personas mayores (von Hehn y

20 col., 2012) [2]. A nivel mundial, el 60 % de las personas que sufren dolores son menos aptas para trabajar y el 20 % afirman haber perdido su empleo a causa del dolor. Al mismo tiempo, en 2010 se vendieron 20.000 millones de unidades de medicamentos analgésicos, frente a 14.000 millones en 2005 (+9,3 %). En 2017, el mercado mundial del dolor alcanzó los 61.050 millones de dólares y se espera que genere 77.130 millones de dólares para 2023, registrando una tasa de crecimiento anual compuesta del 4 % de 2017 a 2023.

25 Los dolores neuropáticos afectan aproximadamente al 7 % de la población general y al 25 % de los pacientes con dolor crónico. Son de dos tipos: dolor neuropático periférico (dependiendo de su origen, puede afectar a los territorios de un plexo, una raíz, un tronco o ser más difuso como parte de polineuropatías) y dolor neuropático central (lesiones que afectan las vías sensitivas o del control del dolor). Las neuropatías periféricas inducidas por la quimioterapia, efectos adversos frecuentes de muchos agentes anticancerígenos, se caracterizan por dolores crónicos importantes que afectan de forma duradera a la calidad de vida de los pacientes y conllevan adaptaciones posológicas con el riesgo de una disminución de la eficacia clínica. La farmacopea analgésica, cada vez más escasa (retirada del Di-

35 La innovación lleva más de 50 años estancada y la mayoría de los nuevos medicamentos propuestos son simples reformulaciones o combinaciones de medicamentos existentes. Los metanálisis recientes muestran que ningún tratamiento para el dolor neuropático ha sido realmente eficaz hasta la fecha, excepto la gabapentina y la duloxetina, con una puntuación de eficacia aún baja (Hershman y col., 2014) [3].

40 La familia de los canales iónicos HCN (Ludwig y col., Nature 1998; Santoro y col., 1998; Seifert y col., 1999) [4-6], que comprende cuatro miembros HCN1-4, podría ofrecer excelentes oportunidades para el desarrollo de nuevos medicamentos destinados a reducir la frecuencia cardíaca y nuevos analgésicos. Los canales HCN están ampliamente distribuidos en las vías del dolor y juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático (Dunlop y col., 2009; Lewis y col., 2011) [7, 8]. Se ha demostrado que los bloqueadores HCN no selectivos alivian los síntomas de dolor en modelos de dolor neuropático en roedores (Descœur y col., 2011; Young y col., 2014) [9, 10]. Sin embargo, sus efectos secundarios cardíacos y visuales (p. ej., bloqueadores pan-HCN) limitan la traducción clínica de su uso para tratar el dolor neuropático.

50 Es interesante ver que la función de los canales HCN está estrechamente regulada por una subunidad auxiliar, la proteína de interacción Rab8b (TRIP8b), que no se expresa en el corazón. Esta proteína citoplasmática se une al extremo C-terminal de las subunidades del canal HCN a través de dos sitios de contacto (Lewis y col., 2009) [11]. Además, se determinó por cristalografía de rayos X la estructura atómica de la región tetratricopéptida (TPR) de TRIP8b en complejo con un péptido de 6 aminoácidos que representa el extremo C-terminal de HCN2 (Bankston y col., 2012) [12].

55 En el contexto actual, la mayoría de los trabajos que se centran en el desarrollo de inhibidores que actúan directamente sobre los canales HCN, la selección de TRIP8b y/o la interacción TRIP8b-HCN, podrían ofrecer una nueva posibilidad para modular la actividad del HCN en los estados de dolor, sin riesgo de afectar las funciones cardíacas y visuales.

60 También se consideran peptoides y peptidomiméticos para la prevención y/o tratamiento del dolor crónico (Hruby, Peptides, 116: 63-67, 2019; Solicitud de patente EP 2289886) [29, 30].

Descripción de la invención

65 La presente invención se basa en la hipótesis de que la alteración de las interacciones TRIP8b-HCN, que conduce a una disminución de las corrientes (I_h) inducidas por los canales HCN, podría tener un efecto analgésico en modelos

de neuropatías periféricas agudas y crónicas inducidas por el oxaliplatino en roedores, que reproducen fielmente la sintomatología humana.

La prueba de la eficacia de esta estrategia se validó inicialmente con la ayuda de NUCC-5953, una molécula procedente de un cribado de un banco de 20.000 moléculas, capaz de alterar la interacción TRIP8b-HCN (Han y col., 2015) [13]. Los inventores han demostrado así que la hipersensibilidad aguda al frío inducida por el oxaliplatino se revierte con dependencia de la dosis mediante la inyección intratecal (Figura 2) o sistémica (Figura 3) de NUCC-5953. No se ha observado ninguna alteración de la actividad locomotora. Los datos preliminares también mostraron que la administración de NUCC-5953 reduce el direccionamiento a la membrana y, por lo tanto, la actividad de HCN1 y 2 observada en animales neuropáticos (Figura 5B). Además, la aplicación *in vitro* de NUCC-5953 no mostró ningún efecto sobre las corrientes inducidas por la activación de HCN en las células cardíacas (a diferencia de los bloqueadores no específicos de los canales HCN, Figura 6).

Los inventores decidieron entonces diseñar bloqueadores específicos de la interacción TRIP8b-HCN basándose en el modo de interacción de las dos proteínas. Sin embargo, si bien las interacciones proteína-proteína (PPI) juegan un papel esencial en todos los niveles de la función celular, lo que las convierte en objetivos terapéuticos indiscutibles, el diseño de potentes inhibidores de PPI sigue siendo un verdadero desafío. Las moléculas de bajo peso molecular, aunque muy estudiadas, son poco adecuadas para competir con interacciones que impliquen grandes superficies (>800 Å). Además, para diseñar inhibidores eficaces, es importante poder imitar el segmento de reconocimiento proteína/proteína “hot segment” en su conformación bioactiva. Los péptidos son los compuestos de elección para diseñar estos nuevos inhibidores, siempre que puedan resolver los problemas de estabilidad metabólica y conformacional, pero también de penetración celular, para alcanzar objetivos intracelulares.

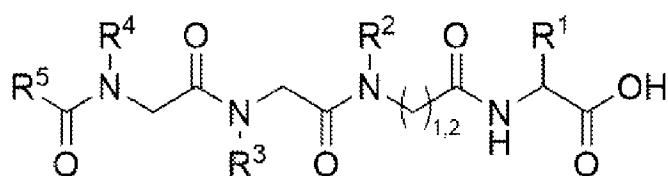
Los inventores recurrieron entonces a una química peptidomimética a través de la síntesis de peptoides (oligómeros de glicina N-sustituídos) que son particularmente adecuados para el desarrollo de inhibidores dirigidos a una interacción proteína-proteína, y que también pueden denominarse peptómeros (es decir, oligómeros que combinan monómeros “peptoides” y monómeros “aminoácidos” —Ostergaard y col., 1997, [17]— o híbridos péptido-peptoides).

De hecho, son imitadores peptídicos sintéticos cuya naturaleza oligomérica permite una gran modularidad en términos de tamaño y diversidad química.

Permiten un diseño estructural fino y poseen una mejor biodisponibilidad que los péptidos (resistencia a las proteasas, mejor permeabilidad de la membrana, esqueleto no inmunogénico).

Por lo tanto, los inventores diseñaron nuevos peptoides dirigidos a la interacción entre los dominios TPR de TRIP8b y el extremo C-terminal de HCN, capaces de ejercer un efecto analgésico en un modelo de neuropatía aguda inducida por el oxaliplatino, sin efectos cardíacos o visuales no deseables.

La presente invención tiene como objeto un compuesto peptídico de fórmula general (I) siguiente:



I

donde

R¹ es independientemente CH₃ (L-Ala), CH(CH₃)₂ (L-Val), CH(CH₃)CH₂CH₃ (L-Ile), CH₂CH(CH₃)₂ (L-Leu y D-Leu), CH₂C(CH₃)₃, C(CH₃)₃, CH₂(ciclobutilo);

R², R³ y R⁴ son las cadenas laterales de las unidades peptoides incorporadas secuencialmente durante la síntesis a partir de aminas primarias;

R² y R³ se eligen de forma independiente entre: CH₂CH(CH₃)₂, CH₂CH₂NH₂, CH₂CH₂OH, CH₂CH₂CH₂OH, CH₂CH(OH)CH₃, CH₂CONH₂, CH₂CH₂CONH₂. Las cadenas laterales con función alcohol o amina se han incorporado a los oligómeros en forma protegida: éter de sililo para la función alcohol, y carbamato de tert-butilo (Boc) para la función amina;

R⁴ es un grupo alifático o aromático elegido entre:

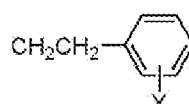
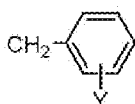
CH₂CH(CH₃)₂ (isobutilo)

CH₂C(CH₃)₃ (neopentilo)

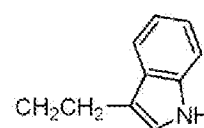
CH₂- (ciclohexilmetilo)

 (isopropilo)

CH₂CH₂CH₂CH₃ (*n*-butilo)



Y = H, OMe, CF₃



(CH₂)_n-Z

n = 2 a 8

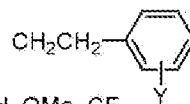
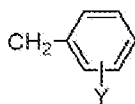
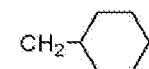
Z = OH, NH₂, COOH, SH, N₃, C≡CH

R⁵ es independientemente CH₃, CH(CH₃)₂, CH₂C₆H₅, C₆H₄X (donde X en posición orto, meta o para es independientemente H, OMe, CF₃, CH₃, CH₂CH₃, F, Br, Cl, NO₂), 3-indolilo, 3-quinolinilo.

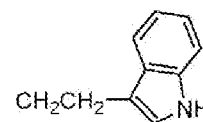
Ventajosamente, R⁴ es un grupo alifático o aromático elegido entre:

CH₂CH(CH₃)₂ (isobutilo)

CH₂C(CH₃)₃ (neopentilo)



Y = H, OMe, CF₃



Ventajosamente, R⁵ es independientemente CH₃, CH₂C₆H₅, C₆H₄X (donde X en posición orto, meta o para es independientemente H, OMe, CF₃, CH₃, CH₂CH₃, F, Br, Cl), 3-indolilo, 3-quinolinilo.

Ventajosamente, los peptoides de la presente invención se eligen entre los peptoides de fórmula general (I) en la que:

- R¹ es independientemente CH₃ (L-Ala), CH(CH₃)₂ (L-Val), CH(CH₃)CH₂CH₃ (L-Ile), CH₂CH(CH₃)₂ (L-Leu y D-Leu), CH₂C(CH₃)₃, C(CH₃)₃, CH₂(ciclobutilo);

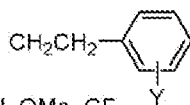
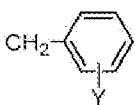
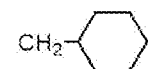
- R², R³ y R⁴ son las cadenas laterales de las unidades peptoides incorporadas secuencialmente durante la síntesis a partir de aminas primarias;

- R² y R³ se eligen de forma independiente entre: CH₂CH₂NH₂, CH₂CH₂OH, CH₂CH₂CH₂OH, CH₂CH(OH)CH₃, CH₂CONH₂, CH₂CH₂CONH₂. Las cadenas laterales con función alcohol o amina se han incorporado a los oligómeros en forma protegida: éter de sililo para la función alcohol, y carbamato de tert-butilo (Boc) para la función amina;

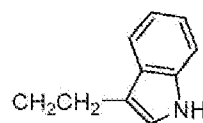
- R⁴ es un grupo alifático o aromático elegido entre:

CH₂CH(CH₃)₂ (isobutilo)

CH₂C(CH₃)₃ (neopentilo)



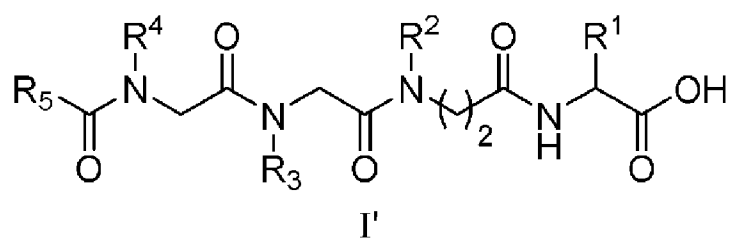
Y = H, OMe, CF₃



- R⁵ es independientemente CH₃, CH₂C₆H₅, C₆H₄X (donde X en posición orto, meta o para es independientemente H, OMe, CF₃, CH₃, CH₂CH₃, F, Br, Cl), 3-indolilo, 3-quinolinilo.

Preferiblemente, los peptoides de la presente invención, de fórmula general (I), tienen 2 átomos de carbono en la segunda unidad (comenzando desde el extremo C-terminal).

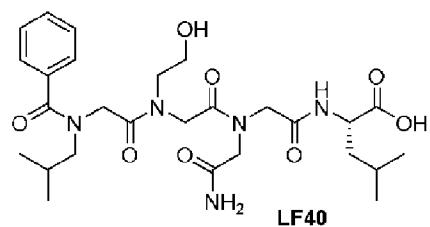
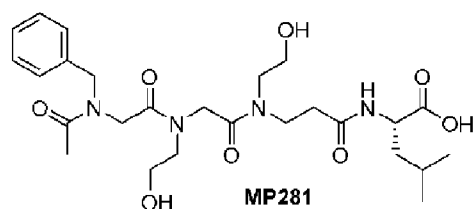
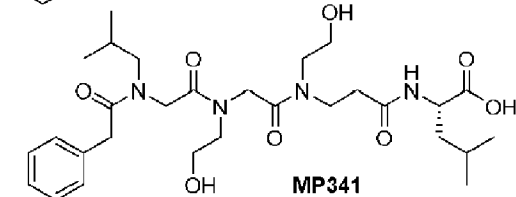
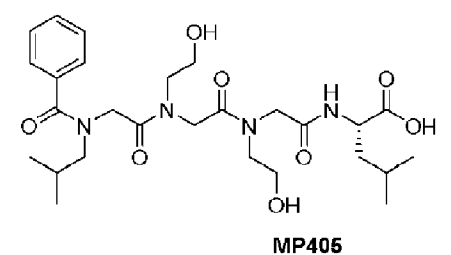
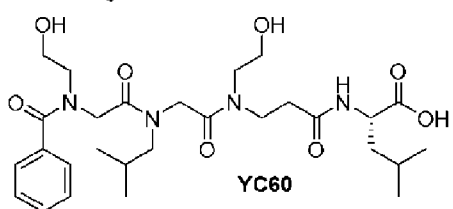
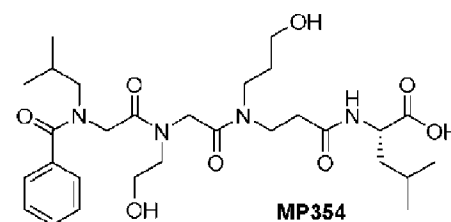
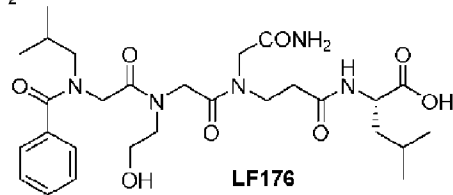
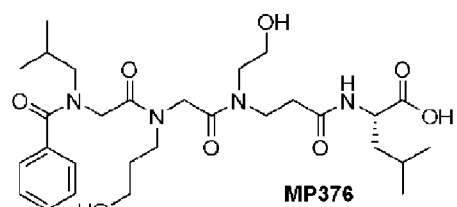
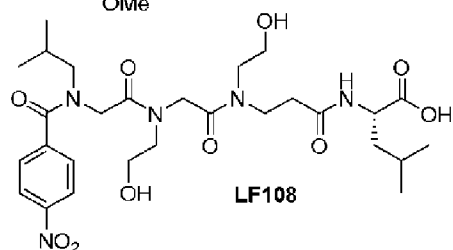
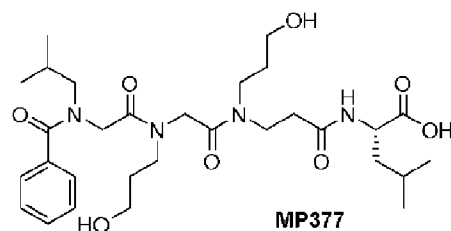
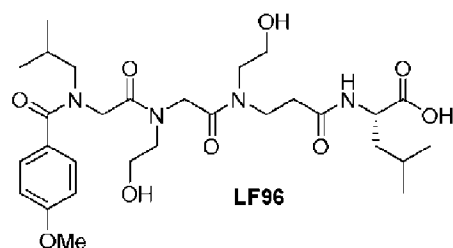
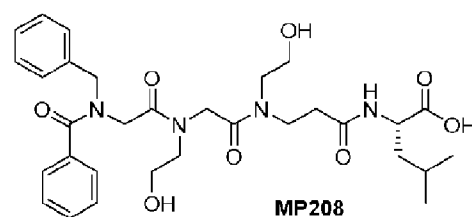
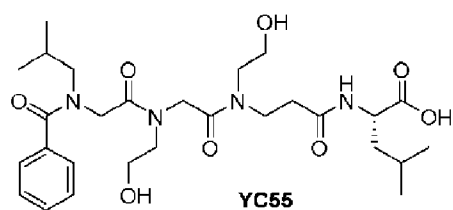
Ventajosamente, los peptoides de la presente invención se eligen entre los peptoides de fórmula general (I') siguiente:

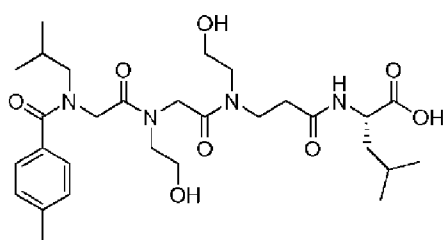


donde

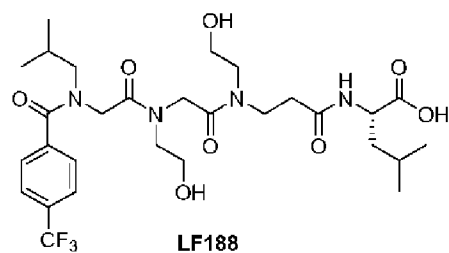
R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son como se definieron anteriormente.

Según una realización particular, los peptoides de la presente invención tienen las siguientes fórmulas:

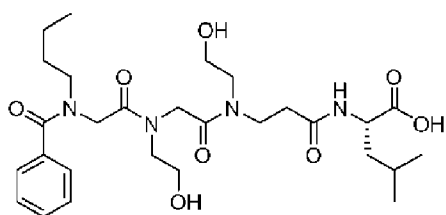




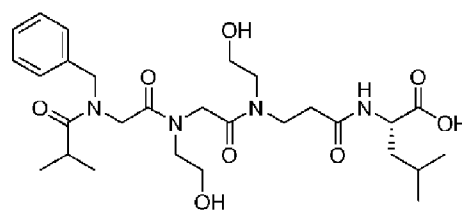
LF126



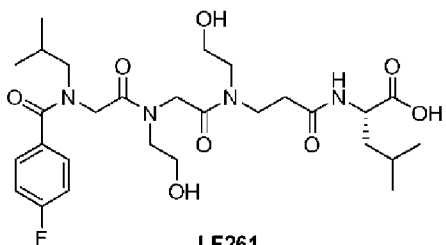
LF188



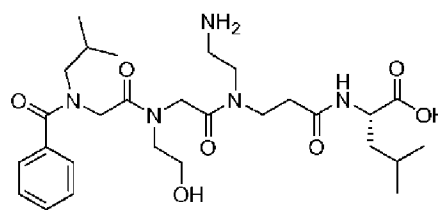
LF222



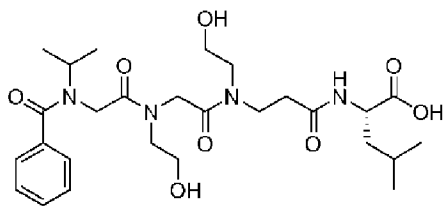
LF239



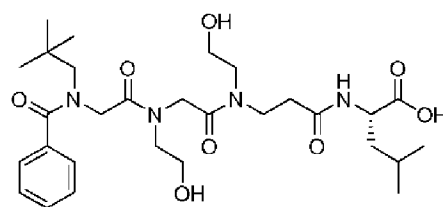
LF261



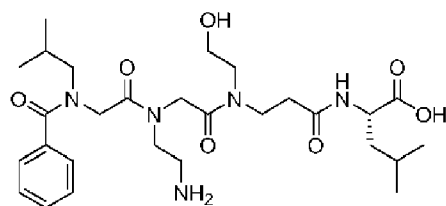
LF275



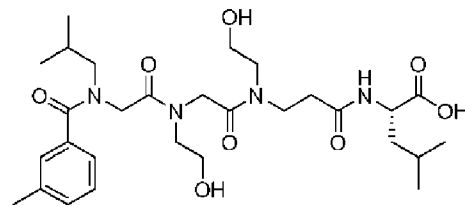
LF295



LF306

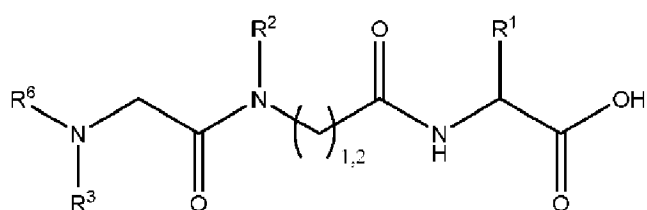


LF329



LF400

La presente invención también tiene por objeto un intermediario de síntesis del peptido de fórmula general (I), comprendiendo dicho peptido 3 unidades. Dicho intermediario de síntesis es un peptido de fórmula general (II) siguiente:



II

donde

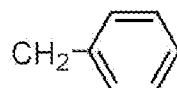
R^1 , R^2 y R^3 son como se definieron anteriormente;

R^6 es H, R^3 , COR^5 (donde R^5 es como se definió anteriormente) o R^7 ;

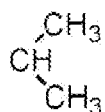
R^7 es independientemente un grupo entre:

$(CH_2)_wCH_3$ alquilo ($w = 1-4$)

$(CH_2)_wCH_3$ alquilo ($w = 1-4$)



(fenilmetilo)



(isopropilo)



(fenilo)



(ciclohexilo)

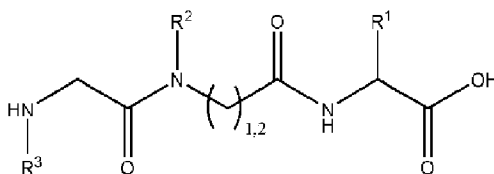
En particular, la presente invención tiene por objeto los peptoides de fórmula (II) en la que R^6 es H.

En particular, la presente invención tiene por objeto los peptoides de fórmula (II) en la que R^6 es COR^5 .

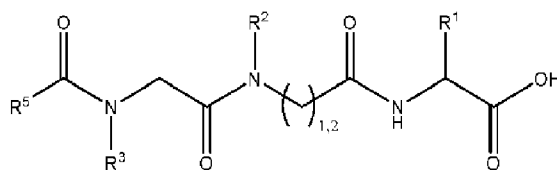
En particular, la presente invención tiene por objeto los peptoides de fórmula (II) en la que R^6 es R^7 .

En particular, la presente invención tiene por objeto los peptoides de fórmula (II) en la que R^6 es R^3 .

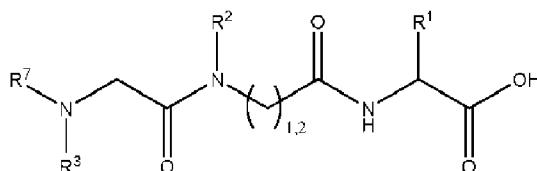
Ventajosamente, los peptoides según la invención se pueden elegir entre los peptoides de las siguientes fórmulas generales (IIa), (IIb), (IIc) y (IId):



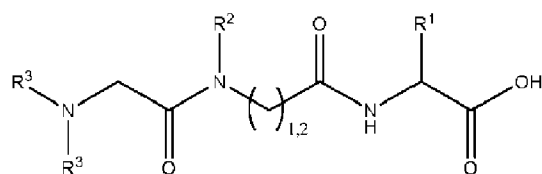
IIa



IIb



IIc

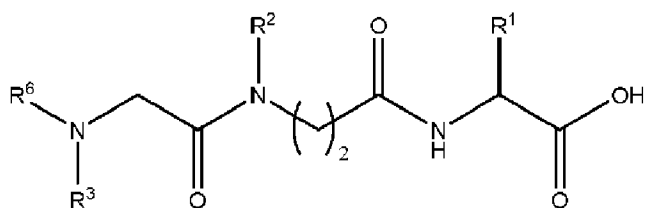


II'd

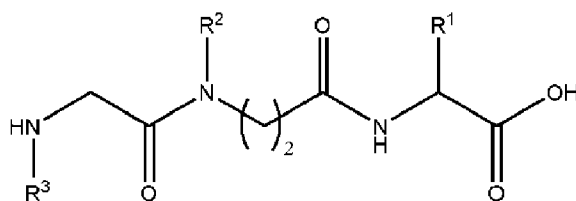
donde

R^1 , R^2 , R^3 , R^5 y R^7 son como se definieron anteriormente.

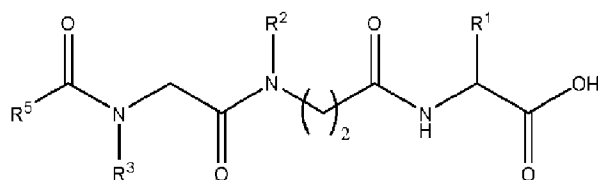
Preferiblemente, los peptoides de la presente invención, de fórmula (II), (II'a), (II'b), (II'c) o (II'd), tienen 2 átomos de carbono en la segunda unidad (a partir del extremo C-terminal). Ventajosamente, los peptoides se eligen entre los peptoides de las siguientes fórmulas (II'), (II'a), (II'b), (II'c) o (II'd):



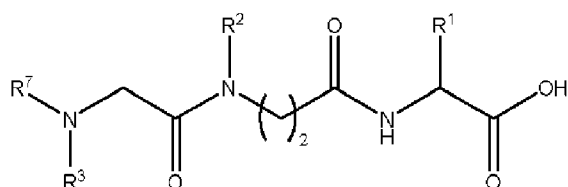
II'



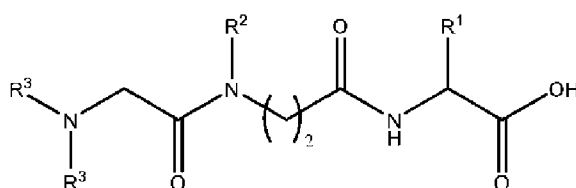
II'a



II'b



II'c



II'd

donde

R^1 , R^2 , R^3 , R^5 , R^6 y R^7 son como se definieron anteriormente.

- 5 La presente invención también tiene por objeto una composición farmacéutica que comprende un peptido según la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también tiene por objeto un peptido o una composición farmacéutica según la presente invención para su uso como medicamento.

- 10 La presente invención también tiene por objeto un peptido o una composición farmacéutica según la invención para su uso en la prevención o el tratamiento del dolor crónico, en particular del dolor crónico de origen neuropático, más concretamente del dolor neuropático periférico, por ejemplo, inducido por quimioterapia.

- 15 En un contexto en el que la innovación terapéutica en el campo de los analgésicos está estancada, los peptoides de la presente invención y su potencial terapéutico pueden tener un impacto significativo en la mejora de la calidad de vida de los pacientes que sufren dolores neuropáticos inducidos por fármacos contra el cáncer y, posiblemente, en su supervivencia. Además, estando los canales HCN también implicados en la etiología de diversos dolores de origen neuropático e inflamatorio, los peptoides de la presente invención abren la vía a nuevas clases de medicamentos
20 analgésicos mucho más activos sobre diferentes tipos de dolor crónico.

Breve descripción de las figuras

- 25 La Figura 1 representa la expresión de las proteínas HCN1 (A), HCN2 (B) y TRIP8b (C) en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, GRD, 4 días después de la administración de vehículo u oxaliplatino (6 mg/kg, i.p.). La expresión de la proteína TRIP8b en el asta posterior de la médula espinal 4 días después de la administración de vehículo u oxaliplatino (6 mg/kg, i.p.) (D) o después de la administración repetida (dos veces por semana durante tres semanas) de vehículo u oxaliplatino (E) N=3/grupo, prueba de Mann-Whitney.

- 30 La Figura 2 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico dependiente de la dosis en ratones OIPN (ratón modelo de neuropatía inducida por oxaliplatino) (n=8) tratados con el vehículo o NUCC5953 (0,2, 1 o 5 μ g, i.t.); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

- 35 La Figura 3 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico dependiente de la dosis en ratones OIPN (n=8) tratados con el vehículo, NUCC5953 (4 mg/kg, s.c.) o duloxetina (30 mg/kg, s.c.); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

- 40 La Figura 4 representa los histogramas que muestran la latencia a la caída (A) y a la velocidad de caída (B) de ratones tratados con el vehículo o NUCC5953 (4 mg/kg, s.c.) sometidos a una prueba del cilindro giratorio a velocidad creciente (de 4 a 40 rpm durante 10 min).

- 45 La Figura 5 representa (A) diseño del estudio, (B) la expresión (membranaria) subcelular de HCN1, HCN2 y TRIP8b en los GRD de animales tratados con el vehículo (V), oxaliplatino (O) u oxaliplatino+NUCC5953 (5 nmol, i.t.) (N).

- La Figura 6 representa la ausencia de efecto de NUCC5953 sobre la amplitud de la corriente I_f a diferencia de la ivabradina (IVA).

- 50 La Figura 7 representa el ritmo cardíaco de los ratones (RC): (A) valor de referencia, (B) media de la frecuencia cardíaca durante 30 minutos después de la inyección de NUCC5953 (4 mg/kg, s.c.) y (C) valor medio al final de los 30 minutos; los valores son una media $\pm$ SEM (n=3).

- 55 La Figura 8 representa la dinámica molecular de TRIP8b en interacción con el péptido SNL.

- La Figura 9 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico dependiente de la dosis en ratones OIPN (n=8) tratados con el vehículo o el peptido YC55 (0,2, 1 o 5 μ g, i.t.); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

- 60 La Figura 10 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico dependiente de la dosis en ratones OIPN (n=8) tratados con el vehículo o el peptido YC55 (2,5; 5 o 10 mg/kg, s.c.); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

- 65

La Figura 11 representa histogramas que muestran la latencia a la caída (A) y a la velocidad de caída (B) de ratones tratados con el vehículo, el YC55 (2,5; 5 o 10 mg/kg, s.c.) o el valium (2,5 mg/kg, s.c.) sometidos a una prueba del cilindro giratorio a velocidad creciente (de 4 a 40 rpm durante 10 min). *** $p < 0,001$ T30 min tras la administración (■) frente a T0 (□) para una molécula dada, prueba de la *t* de Student.

La Figura 12 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM de los umbrales mecánicos (en g) y del umbral de latencia a la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) de ratas PTX (n=7-9) tratadas con el vehículo o el peptido YC55 (0,2; 1 o 5 μ g, i.t.); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

La Figura 13 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) de ratas neuropáticas (n=7-9) tratadas con el vehículo (●) o el peptido YC55 (5 μ g, i.t.); *** $p < 0,001$, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

La Figura 14 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico de ratones OIPN (n=7-9) tratados con el vehículo o los peptoides MP208, MP405, o YC55 (5 μ g, i.t.); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

La Figura 15 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico de ratones OIPN (n=7-9) tratados con el vehículo o los peptoides MP376, MP354, o MP341 (10 mg/kg, s.c.); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

La Figura 16 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico de ratones OIPN (n=7-9) tratados con el vehículo o los peptoides LF108, LF306, o LF188 (5 μ g, i.t.); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

La Figura 17 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico de ratones OIPN (n=7-9) tratados con el vehículo o los peptoides LF295, LF400, o LF329 (5 μ g, i.t.); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

La Figura 18 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico de ratones OIPN (n=7-9) tratados con el vehículo o los peptoides LF126, LF261, o LF275 (5 μ g, i.t.); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

La Figura 19 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico de ratones OIPN (n=7-9) tratados con el vehículo o los peptoides LF222, LF239, o LF176 (5 μ g, i.t.); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

La Figura 20 representa (A) diseño del estudio, (B) evolución temporal de la media $\pm$ SEM desde el umbral de latencia hasta la inmersión de la pata (en s) y (C) área bajo la curva (ABC, s.min) del efecto analgésico de ratones OIPN (n=7-9) tratados con el vehículo o el peptido LF369 (5 μ g, i.t.); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, frente al grupo veh., ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey.

Ejemplos

Ejemplo 1: material y métodos

Animales

Los experimentos se realizaron con ratones macho C57Bl/6JRj de 20 a 24 g, o ratas Sprague-Dawley macho de 150 a 175 g, proporcionados por los laboratorios Janvier (Francia), mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, y alimentados y abrevados *ad libitum*. Los experimentos sobre el comportamiento fueron realizados a ciegas, en una habitación tranquila, por el mismo investigador para una prueba determinada, teniendo mucho cuidado de minimizar o evitar las molestias a los animales. Todas las intervenciones sobre los animales han sido aprobadas por el comité local de ética animal, y los experimentos se han realizado según las directrices proporcionadas por la Comunidad Europea sobre el cuidado y uso de los animales (Directiva 2010/63/UE).

Pruebas sobre el comportamiento

Prueba de Von Frey: La sensibilidad mecánica se evaluó con filamentos de Von Frey calibrados de 0,07 g, 0,6 g o 1,4 g. Los filamentos se aplicaron cinco veces en orden de rigidez creciente, perpendicular a la superficie plantar de la pata trasera, y se presionaron hasta que se doblaron. Se contó el número de respuestas para una fuerza de filamento dada.

Prueba de inmersión: La cola o la pata se sumergió en un baño de agua a 10 °C o 46 °C hasta que se observó una retirada (tiempo de corte: 30 s). Se calculó la media de dos determinaciones distintas de la latencia de la retirada (Janssen, Niemegeers y Dony, 1963) [14].

Prueba de presión de las patas en ratas: Las ratas fueron sometidas a la prueba de presión de las patas descrita anteriormente por Randall y Selitto (1957) [15]. Los umbrales nociceptivos, expresados en gramos, se midieron con un analgesímetro Ugo Basile (Apelex, diámetro de la punta de la sonda 1 mm, peso 30 g) aplicando una presión creciente sobre la pata trasera derecha de las ratas hasta obtener un signo de dolor (umbral de vocalización) (el corte fue de 750 g). Antes de los tratamientos, se habituó a las ratas a la prueba manipulándolas sin someterlas a la presión de la pata. Luego, después de obtener dos valores de umbral de vocalización estables consecutivos, se evaluaron los efectos del tratamiento después de 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Los resultados se expresan en forma de umbrales de vocalización, en gramos. Para estudiar los efectos globales, se calcularon las áreas bajo las curvas de evolución en el tiempo (ABC, g.min) de los efectos antihiperálgicos a partir de las puntuaciones individuales cada vez, utilizando el método trapezoidal. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba de Bonferroni, cuando se estudió la evolución temporal de los efectos. Se utilizó un ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Student Newman-Keuls, para analizar el efecto de los diferentes tratamientos determinados por las ABC. El nivel de significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

Prueba del cilindro giratorio: Para la prueba del cilindro giratorio (Bioseb), primero se habituó a los animales a permanecer en el cilindro inmóvil durante 10 minutos antes de pasar a otros 10 minutos con una velocidad de rotación de 4 revoluciones por minuto. Los animales recibieron el medicamento inmediatamente después del entrenamiento, y la prueba se realizó 30 minutos después. La prueba consistió en medir la latencia a la caída de los animales cuando la rotación pasa de 4 a 40 rpm de forma lineal durante 5 min. Se calculó la media de los dos valores más cercanos de 3 ensayos.

Registro de la frecuencia cardíaca in vivo: Los registros telemétricos del ECG se realizaron utilizando transmisores telemétricos TA10EA-F20 (DSI) en una bolsa subcutánea con electrodos con cable emparejados colocados en el tórax, como se publicó anteriormente (Mesirca y col., 2014) [27].

Modelo de dolor animal

Neuropatía aguda inducida por el oxaliplatino en ratones: Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de oxaliplatino 6 mg/kg disuelto en glucosa al 5 % directamente después de la primera evaluación del comportamiento. 90 horas después de la administración del medicamento, correspondiente al tiempo necesario para alcanzar el pico de hiperalgesia (Descœur y col., 2011) [9], se realizó una segunda evaluación de la sensibilidad al frío y la sensibilidad mecánica.

Neuropatía aguda inducida por paclitaxel en ratas: Las ratas recibieron una inyección i.p. de sulfóxido de dimetilo (DMSO; disolvente) o de 1 mg/kg/1 mL de paclitaxel (Sigma-Aldrich, Lyon, Francia) en los días D0, D2, D4 y D7. La prueba de comportamiento se realizó el día de la primera inyección de paclitaxel (D0) y los días 10 (D10) y 14 (D14) después de la inyección de paclitaxel.

La ligadura de los nervios espinales provocó una neuropatía en la rata: Según el procedimiento de Kim y Chung (1992) [16], las ratas fueron colocadas en posición acostada y anestesiadas con 10 mg/kg de xilacina y 75 mg/kg de ketamina (i.p.). A continuación, se afeitó el pelaje del lado izquierdo de la columna vertebral para exponer la piel. La piel se cortó paralelamente a la columna vertebral y se separaron los músculos paravertebrales. Se retiró la apófisis transversa L5 hasta dejar expuesto el nervio espinal L5. El nervio L5 se aisló y ligó con hilo de seda. Finalmente, se suturaron las incisiones musculares y cutáneas, y se desinfectó la herida con yodóforo y alcohol etílico al 75 %. En el grupo de control, las ratas se sometieron a la misma intervención quirúrgica sin la ligadura del nervio.

Pruebas ex vivo

Aislamiento y cuantificación del ARN: Se diseccionaron y agruparon los pares de GRD de los segmentos lumbares L4 a L6. El ARN se extrajo con el reactivo TRIzol® (Nitrógeno) según las instrucciones del fabricante (ThermoFisher). La calidad del ARN se evaluó con el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies); las muestras cuyo RIN (siglas en inglés del número de integridad del ARN) fue superior a 8, se conservaron para posteriores análisis. La transcripción inversa se realizó con la transcriptasa inversa SuperScript II según el protocolo proporcionado por Invitrogen. Para la PCR cuantitativa en tiempo real, la amplificación se realizó utilizando el kit Light Cycler Fast Start DNA (Roche Diagnostics), y la cantidad de ADN en tiempo real se midió con un termociclador Mastercycler Realplex (Eppendorf). La media de la cantidad relativa de ADNc de cada triplicado se calculó utilizando una curva de concentración estándar y se normalizó en el ADNc del gen GUS. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: preincubación durante

7 min a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 20 s a 95 °C y 20 s a la temperatura específica de hibridación del par de cebadores seguido de 20 s a 72 °C.

Secuenciación del ARN: Utilizamos el análisis de secuenciación de ARN en los GRD L4-L5-L6 de ratones tratados con oxaliplatino (3 mg/kg, i.p.) o en el vehículo dos veces por semana durante 3 semanas. Al final del experimento (D21), los ratones fueron anestesiados y sacrificados, y los GRD L4-L5-L6 fueron recogidos rápidamente, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su uso. Los ARN totales de los GRD L4-L5-L6 se extrajeron utilizando el kit RNeasy Micro (Qiagen) según el protocolo del fabricante y el ARN ribosómico se eliminó utilizando Ribo-Zero Plus rRNA depletion kit (Illumina). La concentración de ARN se determinó utilizando la placa de cuantificación de ácidos nucleicos Take3 (Epoch, BioTek, EE. UU.). La integridad del ARN fue analizada por un instrumento de electroforesis capilar (Fragment Analyser, Agilent®) y enviada a Fasteris (<https://www.fasteris.com>) para la secuenciación del ARN. Las bibliotecas se han preparado utilizando el protocolo TruSeq de Illumina, y se ha realizado una secuenciación basada en síntesis utilizando una plataforma HiSeq 2500 (Illumina). El análisis se realizó en diferentes etapas: mapeo de las uniones de empalme (TopHat2), recuento (HTSeq-count), filtrado, normalización (edgeR, DESeq y DESeq2) y análisis diferencial (edgeR, DESeq y DESeq2) realizado por Benjamin Bertin y Yoan Renaud (GreD, Clermont-Ferrand).

Fraccionamiento de membranas: Los tejidos se homogeneizaron en un tampón HEPES (20 mM HEPES pH 7,4, 320 mM de sacarosa, 5 mM de EDTA, 5 mM de EGTA) que contenía inhibidores de proteasas a 4 °C, se sometieron a ultrasonidos y se centrifugaron a 1000 g durante 15 min a 4 °C. Se eliminaron los sedimentos. Para la centrifugación de los orgánulos, los sobrenadantes se centrifugaron a 15.000 g durante 10 minutos a 4 °C y se conservaron los sedimentos de los orgánulos. Para la centrifugación para separar el contenido citosólico, los sobrenadantes se centrifugaron a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C. La fracción citosólica se encontraba en los sobrenadantes, y la fracción de membrana en los sedimentos. Los sedimentos de membranas se volvieron a suspender en el tampón SB (20 mM HEPES pH 7,4, 1 M KI, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA a 4 grados) y se centrifugaron a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C para eliminar las proteínas membranas poco ligadas. Las fracciones membranas se volvieron a suspender posteriormente en el tampón RB (20 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA) que contenía Tritón (1 %) e inhibidores de proteasas. Después de someterlas a ultrasonidos en un baño de hielo, las fracciones membranas se sometieron a una suave agitación durante 2 horas a 4 °C. Las fracciones membranas solubilizadas se centrifugaron a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C. La fracción membrana se encontraba en el sobrenadante. *Western blot:* Los GRD L4 a L6 de tres ratones se agruparon y homogeneizaron en un tampón de lisis que contenía tritón (1 %) e inhibidores de proteasas. Los homogeneizados se centrifugaron a 18.000 g 20 min a 4 °C y se recogieron los sobrenadantes. 50 µg de proteínas totales se separaron por SDS-PAGE en un gel al 7,5 %. Después de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa y la saturación con BSA (5 %), los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución de 1/500 para HCN1 y HCN2 (Neuromab), 1/1000 para TRIP8b (Neuromab) y 1/5000 para Actinβ (Sigma-Aldrich). Después de 3 lavados sucesivos con tampón TBST, los anticuerpos secundarios acoplados HRP correspondientes (ThermoFisher) se incubaron en una dilución a 1/10.000 y se detectaron con el sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoFisher).

Registro por patch-clamp: Los experimentos de electrofisiología se realizaron en células cardíacas marcapasos aisladas como se describió anteriormente (Marger y col., 2011) [28]. Se utilizó la técnica del "patch-clamp" en célula entera para registrar las corrientes If generadas por los canales HCN, empleando un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments Inc., Foster, EE. UU.). Los electrodos de registro de resistencia de -5 m MΩ se llenaron con una solución intracelular que contenía (mM/L): K+-aspartato, 130; NaCl, 10; sal ATP-Na+, 2; fosfato de creatina, 6,6; GTP-Mg2+, 0,1; CaCl2, 0,04 (pCa = 7); Hepes-KOH, 10; (pH = 7,2 con KOH). Se utilizó una solución extracelular de Tyrode que contenía 5 mM de BaCl2 para bloquear las corrientes IK1. El efecto de la molécula NUCC5953 (5 µM) sobre la amplitud y la cinética de la corriente If se comparó con el de la ivabradina (3 µM), ambas diluidas en la solución extracelular. La adquisición de los datos se efectuó utilizando el software pClamp (ver. 9, Axon Instruments Inc.).

Ensayos *in vitro*

Ensayo de polarización de la fluorescencia: se utilizó una prueba basada en la polarización de fluorescencia (FP) para identificar los compuestos capaces de alterar la interacción entre el HCN y la cola TRIP8b, tal y como se ha publicado (Han y col., 2015) [13].

Ejemplo 2: resultados

Por primera vez se observó la presencia del ARNm TRIP8b (los datos RNAseq obtenidos de los GRD de los ratones muestran la presencia (FPKM > 1) de las variantes de empalme 2 a 5: NM_01163516, NM_01163517, NM_01289505, NM_01310460) y de la proteína en las neuronas de los GRD y los GT en ratones. Además, la expresión de transcritos y proteínas de los canales HCN1-2 y de TRIP8b aumentó significativamente en las neuronas periféricas de los animales tratados con oxaliplatino, en comparación con los controles, lo que sugiere la participación de las 2 proteínas en el desarrollo del OIPN (modelo de ratón de neuropatía inducida por oxaliplatino) (Figura 1A-C). El análisis de la expresión de la proteína TRIP8b en la médula espinal de los animales tratados con una sola administración (Figura 1D) o tras la administración repetida (Figura 1E) de oxaliplatino, en comparación con el vehículo, muestra un claro aumento de la proteína TRIP8b bajo el efecto del oxaliplatino.

Utilizando NUCC5953, una molécula capaz de alterar la interacción TRIP8b-HCN (Han y col., 2015) [13], se ha demostrado que la hipersensibilidad aguda al frío inducida por el oxaliplatino puede revertirse en función de la dosis administrada, ya sea por vía i.t. (0,2; 1; 5 µg /ratón; Figura 2) o por vía sistémica (4 mg/kg; Figura 3).

No se observaron alteraciones en la actividad locomotora en la prueba del cilindro giratorio cuando los ratones fueron tratados con NUCC5953 (4 mg/kg) administrado por vía subcutánea (Figura 4).

Al mismo tiempo, los datos preliminares también sugieren que la administración de NUC5953 reduce la sobreexpresión de las proteínas HCN1 y 2 y TRIP8b en la fracción membranaria de las neuronas de los GRD de los animales OIPN (Figura 5).

Los experimentos de patch-clamp en células cardíacas marcapasos aisladas no mostraron ningún efecto del NUCC5953 sobre la amplitud de la corriente If, a diferencia de la Ivabradina, un bloqueador pan-HCN (Figura 6).

NUCC5953 no afecta la frecuencia cardíaca *in vivo* cuando se ha administrado en una dosis analgésica (4 mg/kg, i.p.) (Figura 7). Los resultados muestran que la media de la frecuencia cardíaca no se modifica en tres ratones antes (A), en el momento de la inyección de NUCC5953 (B) y 30 minutos después de la inyección (C).

Ejemplo 3: diseño de los peptidomiméticos

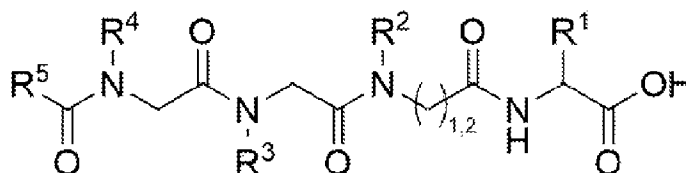
Diseño de los peptidomiméticos

A- Peptidomiméticos tetraméricos

Se han diseñado y sintetizado compuestos peptoides que imitan la secuencia del extremo carboxi-terminal del canal HCN2. El diseño de estos peptidomiméticos se basó en un estudio exhaustivo de la estructura de rayos X de un cocrystal de TRIP8b con la región C-terminal de HCN2, disponible en la base de datos de proteínas (pdb: 4EQF). Se ha realizado un trabajo de modelado preparatorio destinado a complementar y mejorar esta estructura. Las partes que faltaban han sido modeladas por homología de secuencias procedentes de diferentes estructuras PEX5 (PDB: 1FCH, 3R9A, 4KXK, 4KY0, 2J9Q, 2C0M y 2C0L) con una identidad de secuencia del 30 % al 60 % con TRIP8b. El modelo resultante ha permitido identificar los contactos entre residuos responsables de la formación del complejo HCN-TRIP8b. En particular, este estudio permitió identificar dos bolsas hidrófobas del dominio TPR de TRIP8b, esenciales para una buena afinidad de los ligandos a este dominio proteico (Figura 8).

La bolsa hidrófoba 1 de TRIP8b asegura un anclaje de la cadena lateral del residuo C-terminal de los ligandos. Una interacción eficaz de los ligandos con la bolsa hidrófoba 2, situada cerca de la región central de TRIP8b, identificada como sitio de unión al dominio CNBD de HCN, también permite reforzar la afinidad de los inhibidores. Se han diseñado y evaluado por dinámica molecular (DM) varios oligómeros híbridos péptido-peptóide de 4 residuos con diversas cadenas laterales capaces de dirigirse a estas bolsas hidrófobas.

El diseño basado en la estructura ha permitido identificar ligandos peptidomiméticos que interactúan con el sitio de unión peptídica SNL (dominios TPR) de TRIP8b. Estos ligandos tienen una fórmula que está representada por la fórmula LF108 anterior o la fórmula general (I) siguiente:



I

donde

R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son como se definieron anteriormente.

Los compuestos son oligómeros híbridos péptido-peptóide (peptómeros) (Ostergaard y col., 1997) [17]. Estos comprenden cuatro residuos, de los que uno es un α-aminoácido situado en el extremo C-terminal de la secuencia, y tres son residuos peptoides consecutivos. El tercer residuo (desde el extremo N-terminal) es una unidad β-peptóide o una unidad α-peptóide. Los α-peptoides, generalmente llamados "peptoides", se refieren a los oligómeros de glicina N-sustituidos (Simon y col., 1992) [18]. En comparación con los péptidos, las cadenas laterales están unidas a los átomos de nitrógeno de los enlaces de amida, en lugar de a los átomos de carbono α. Los β-peptoides son oligómeros compuestos por unidades de ácido β-aminopropiónico N-sustituido (Hamper y col., 1998) [19]. Por lo tanto, un residuo

β -peptide contiene un grupo metileno complementario en el esqueleto, en comparación con un residuo α -peptide. Los peptoides presentan características ventajosas para el desarrollo de compuestos bioactivos. Estos se prestan a la síntesis en fase sólida, utilizando un enfoque iterativo llamado “submonómero”, en el que cada nueva unidad se construye en dos etapas (Zuckermann y col., 1992) [20]. Los peptoides pueden incorporar cadenas laterales muy diversas, tanto cadenas laterales proteinogénicas como cadenas laterales no naturales (Culf y col., 2010) [21]. Las síntesis de “submonómeros” utilizan moléculas de partida simples, tales como el ácido bromoacético, y aminas primarias para la construcción de unidades α , y cloruro de acrililoilo y aminas primarias para la construcción de unidades β -peptoides. Las aminas primarias, a partir de las cuales se incorporan las cadenas laterales, están disponibles comercialmente por cientos, o pueden prepararse antes de su uso si es necesario. Se ha demostrado que el esqueleto peptoides basado en amidas *N,N*-disustituidas (amidas terciarias) es resistente a las proteasas (Miller y col., 1995) [22]. La presencia de enlaces de amidas terciarias también les confiere una mejor permeabilidad celular (Kwon y col., 2007; Vollrath y col., 2013) [23, 24], y algunos estudios tienden a demostrar que los peptoides son menos inmunogénicos que los péptidos (Li y col., 2010; Chongsirawatana y col., 2008) [25, 26].

Las síntesis se realizaron sobre resina de cloruro de 2-clorotritilo (2-CTC), produciendo un ácido carboxílico en el extremo C-terminal del peptómero después de la escisión. El primer residuo inmovilizado en el soporte, un α -aminoácido, se eligió principalmente del grupo de aminoácidos proteinógenos hidrófobos, entre los que se encuentra la L-leucina que corresponde al extremo C-terminal del péptido SNL. Los α -aminoácidos han sido inmovilizados sobre la resina en una forma protegida N-Fmoc. Después de la eliminación del grupo Fmoc, la extensión de la cadena por los residuos peptoides se llevó a cabo mediante enfoques de “química de submonómeros”. Se aplicaron protocolos conocidos, pero se requirieron algunos ajustes técnicos para la síntesis del monómero β -peptide. El extremo N-terminal se aciló antes de la escisión en condiciones ácidas por el hexafluoroisopropanol (HFIP) y la desprotección de las cadenas laterales por el ácido trifluoroacético (TFA) en el diclorometano.

Los compuestos peptómeros brutos fueron analizados por LC-MS y purificados en cartuchos de cromatografía flash C18 con detección por UV a 214 y 220 nm. Las fracciones puras se recogieron y liofilizaron. Los compuestos puros fueron analizados por HPLC en fase inversa en una columna Nucleodur® C₄ (5 μ m, 300 Å, 250 mm $\times$ 4,6 mm). La Tabla 2 mostrada a continuación presenta los datos obtenidos por HRMS y HPLC de los compuestos.

Tabla 2

Referencia molécula	masa esperada	masa observada / fórmula	tiempo de retención (min) cromatogramas LCMS ^a o HPLC ^b	pureza HPLC (%) ^c
YC55	564,3159	565,3227 [M+H] ⁺ / C ₂₈ H ₄₅ N ₄ O ₈	22,02 ^b	97
YC60	564,3159	565,3229 [M+H] ⁺ / C ₂₈ H ₄₅ N ₄ O ₈	3,74 ^a	n.d.
MP208	598,3003	599,3075 [M+H] ⁺ / C ₃₁ H ₄₃ N ₄ O ₈	22,86 ^b	92
MP281	536,2846	537,2919 [M+H] ⁺ / C ₂₆ H ₄₁ N ₄ O ₈	20,69 ^b	96
MP341	578,3316	579,3388 [M+H] ⁺ / C ₂₉ H ₄₇ N ₄ O ₈	4,05 ^a	n.d.
MP354	578,3316	579,3388 [M+H] ⁺ / C ₂₉ H ₄₇ N ₄ O ₈	3,81 ^a	n.d.
MP376	578,3316	579,3388 [M+H] ⁺ / C ₂₉ H ₄₇ N ₄ O ₈	3,76 ^a	n.d.
MP377	592,3472	593,3545 [M+H] ⁺ / C ₃₀ H ₄₉ N ₄ O ₈	3,81 ^a	n.d.
MP405	550,3003	551,3075 [M+H] ⁺ / C ₂₇ H ₄₃ N ₄ O ₈	21,59 ^b	85
LF40	563,2955	564,3021 [M+H] ⁺ / C ₂₇ H ₄₂ N ₅ O ₈	21,66 ^b	91
LF96	594,3265	595,3337 [M+H] ⁺ / C ₂₉ H ₄₇ N ₄ O ₈	22,06 ^b	92
LF108	609,3010	608,2939 [M+H] ⁺ / C ₂₈ H ₄₂ N ₅ O ₁₀	22,07 ^b	92
LF176	577,3112	578,1388 [M+H] ⁺ / C ₂₈ H ₄₄ N ₅ O ₈	21,53 ^b	97
LF126	578,3316	579,3381 [M+H] ⁺ / C ₂₉ H ₄₇ N ₄ O ₈	24,53 ^b	89
LF188	632,3033	633,3099 [M+H] ⁺ / C ₂₉ H ₄₄ F ₃ N ₄ O ₈	23,30 ^b	98
LF222	564,3159	565,3229 [M+H] ⁺ / C ₂₈ H ₄₅ N ₄ O ₈	21,55 ^b	94
LF239	564,3159	565,3228 [M+H] ⁺ / C ₂₈ H ₄₅ N ₄ O ₈	21,12 ^b	95
LF261	582,3065	583,3138 [M+H] ⁺ / C ₂₈ H ₄₄ FN ₄ O ₈	21,34 ^b	98
LF275	563,3319	564,3395 [M+H] ⁺ / C ₂₈ H ₄₆ N ₅ O ₇	30,79 ^b	94
LF295	550,3003	551,3068 [M+H] ⁺ / C ₂₇ H ₄₃ N ₄ O ₈	20,36 ^b	86
LF306	578,3316	579,3387 [M+H] ⁺ / C ₂₉ H ₄₇ N ₄ O ₈	21,32 ^b	95
LF329	563,3319	564,3383 [M+H] ⁺ / C ₂₈ H ₄₆ N ₅ O ₇	20,90 ^b	95

LF400	578,3316	579,3381 [M+H] ⁺ / C ₂₉ H ₄₇ N ₄ O ₈	21,78 ^b	91
LF369	389,4490	390,2231 [M+H] ⁺ C ₁₇ H ₃₂ N ₃ O ₇	18,32 ^b	90

^a LCMS. Cadena UHPLC Ultimate 3000 RSLC (ThermoScientific), columna Kinetex EVO C18 (100 × 2,1 mm; 1,7 μm) (Phenomenex), caudal: 0,45 mL/min, horno columna: 30 °C, gradiente H₂O (0,1 % ácido fórmico/ ACN (0,1 % ácido fórmico): t = 0 min 95:5; t = 7,5 min 1:99; t = 8,5 min 1:99; t = 9 min 95:5; t = 11 min 95:5.

^b HPLC Cadena Agilent serie 1100, columna Nucleodur® C₄ (5 μm, 300 Å, 250 mm × 4,6 mm), caudal 0,5 mL/min. gradiente H₂O/ACN (0,1 % TFA): t = 0 min 95:5; t = 5 min 95:5; t = 25 min 5:95; t = 35 min 5:95; t = 40 min 95:5, t = 50 min 95:5.

^c Detección por UV 214 nm

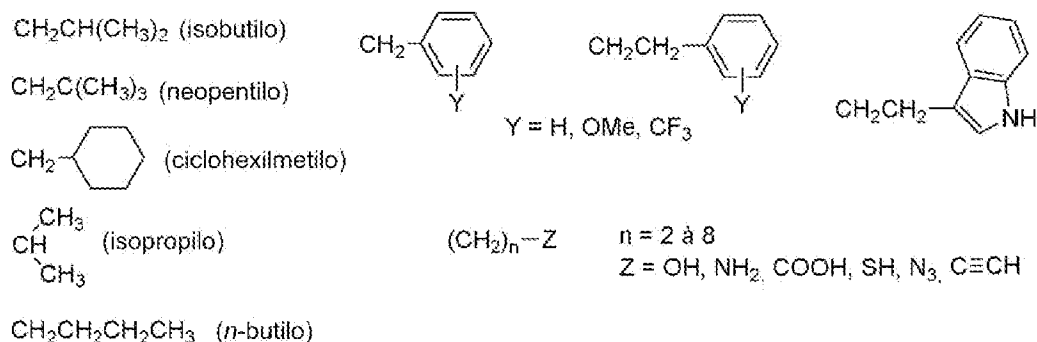
Cadenas laterales

R¹ es independientemente CH₃ (L-Ala), CH(CH₃)₂ (L-Val), CH(CH₃)CH₂CH₃ (L-Ile), CH₂CH(CH₃)₂ (L-Leu y D-Leu), CH₂C(CH₃)₃, C(CH₃)₃, CH₂(ciclobutilo);

R², R³ y R⁴ son las cadenas laterales de las unidades peptoides incorporadas secuencialmente durante la síntesis a partir de aminas primarias;

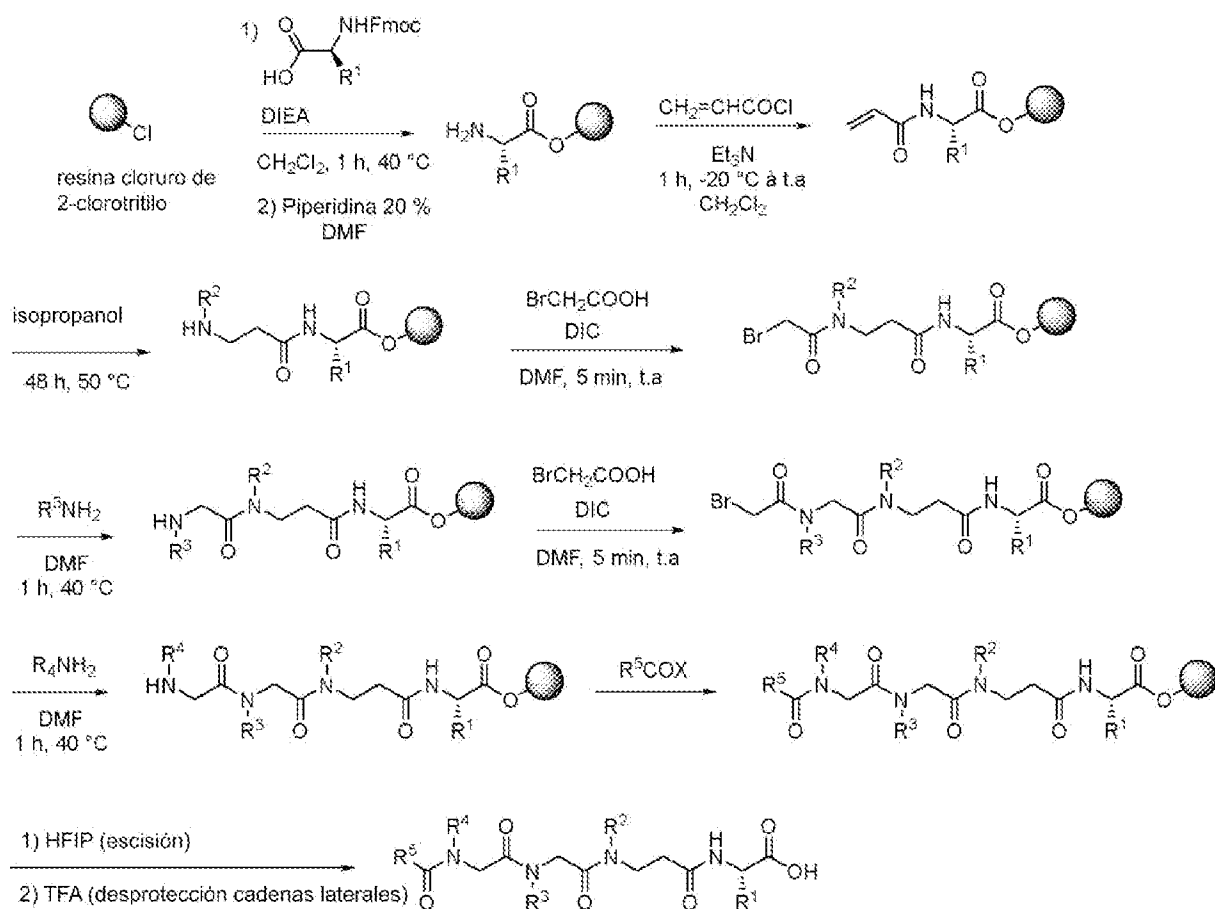
R² y R³ se eligen de forma independiente entre: CH₂CH(CH₃)₂, CH₂CH₂NH₂, CH₂CH₂OH, CH₂CH₂CH₂OH, CH₂CH(OH)CH₃, CH₂CONH₂, CH₂CH₂CONH₂. Las cadenas laterales con función alcohol o amina se han incorporado a los oligómeros en forma protegida: éter de sililo para la función alcohol, y carbamato de tert-butilo (Boc) para la función amina;

R⁴ es un grupo alifático o aromático elegido entre:



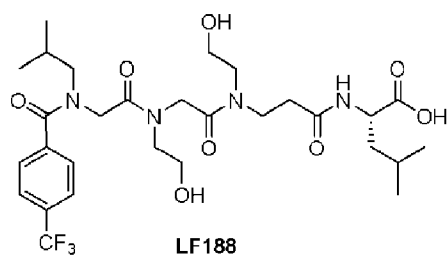
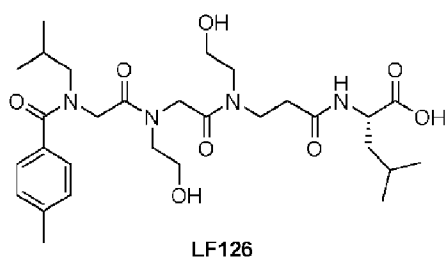
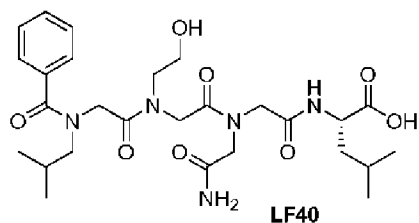
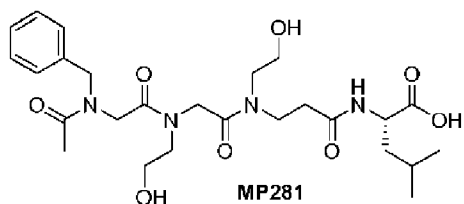
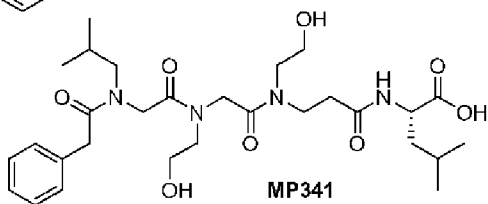
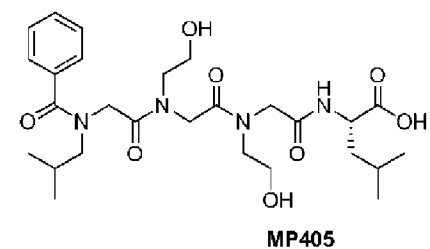
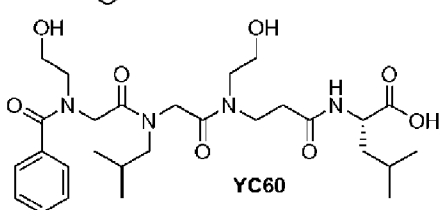
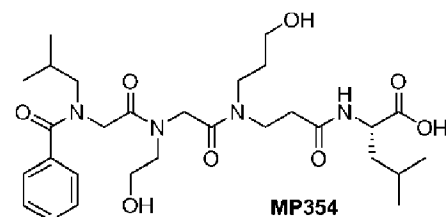
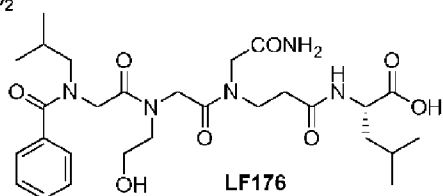
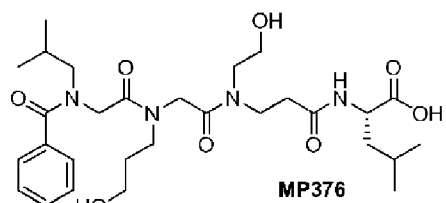
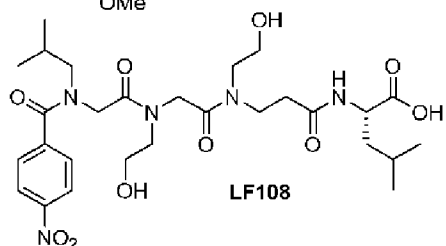
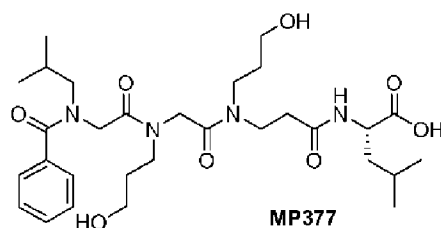
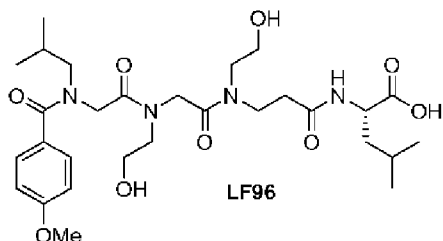
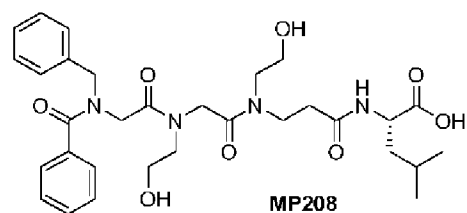
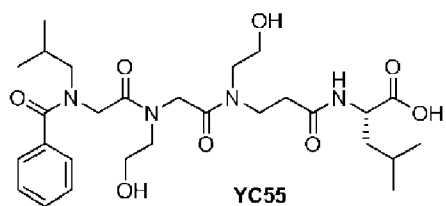
R⁵ es independientemente CH₃, CH(CH₃)₂, CH₂C₆H₅, C₆H₄X (donde X en posición orto, meta o para es independientemente H, OMe, CF₃, CH₃, CH₂CH₃, F, Br, Cl, NO₂), 3-indolilo, 3-quinolinilo.

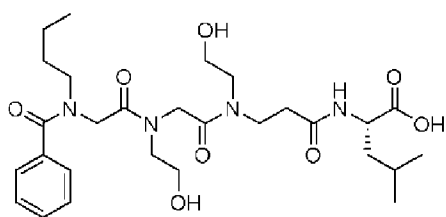
Esquema sintético representativo sobre resina de cloruro de 2-clorotritilo, para la síntesis de peptómeros N-acilados que incorporan un α-aminoácido en el extremo C-terminal, seguido de un residuo β- y dos residuos α-peptoides.



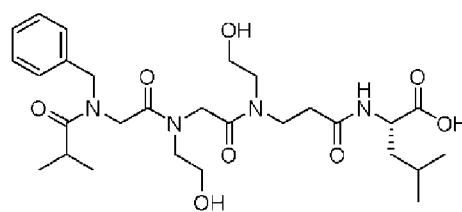
DIEA: diisopropiletilamina; Fmoc: fluorenilmetiloxycarbonilo; DMF: N,N-dimetilformamida; DIC: diisopropilcarbodiimida; HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol; t.a.: temperatura ambiente; TFA: ácido trifluoroacético

Moléculas sintetizadas

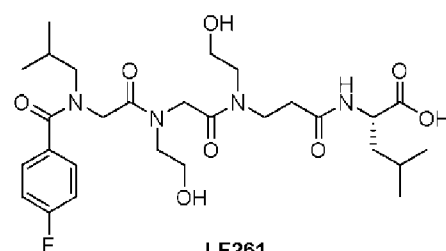




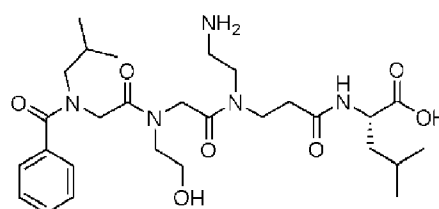
LF222



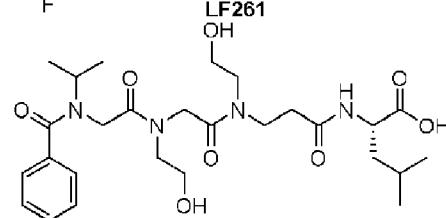
LF239



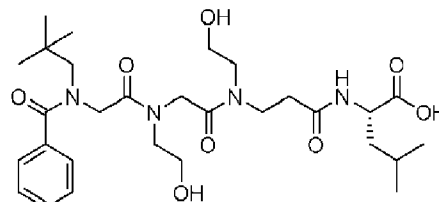
LF261



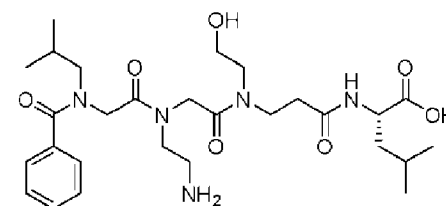
LF275



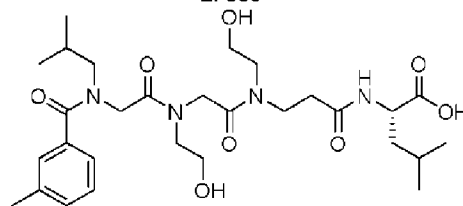
LF295



LF306



LF329



LF400

Síntesis

Los compuestos correspondientes a la fórmula general (I) se sintetizaron en una resina de tipo cloruro de 2-clorotritilo (Novabiochem 100-200 malla) en jeringas de plástico de 5 mL equipadas con un filtro filtrado y una válvula de cierre. Las jeringas se colocaron en una plataforma de calentamiento con agitación orbital durante las reacciones.

En una síntesis típica descrita con L-leucina en el extremo C-terminal y un residuo β -peptido precediendo a este aminoácido, se introdujo la resina de cloruro de 2-clorotritilo ($1,33 \text{ mmol g}^{-1}$, 0,100 g, 0,133 mmol) en 2 mL de CH_2Cl_2 seco ($2 \times 20 \text{ min}$) para hincharla. Después de la filtración, se añadió 0,12 mL de una solución de 2,2 M de Fmoc-Leu-OH en el CH_2Cl_2 (2,0 equivalentes), seguido de 2,0 mL de una solución de 0,4 M de DIEA en el CH_2Cl_2 (6,0 equivalentes). La mezcla se agitó durante 40 minutos a 25°C . La resina fue escurrida, lavada con CH_2Cl_2 ($2 \times 2 \text{ mL}$), y se repitió la fijación de la Fmoc-Leucina a la resina en las mismas condiciones. La resina se lavó con CH_2Cl_2 ($5 \times 2 \text{ mL}$). El grupo Fmoc se eliminó añadiendo 2,0 mL de una solución de piperidina al 20 % en DMF y agitando durante 15 minutos a temperatura ambiente. La operación se repitió en las mismas condiciones, después de lo cual la resina se lavó con DMF ($5 \times 2 \text{ mL}$) y se escurrió.

Introducción del residuo β -peptido. La resina se enfrió con dos lavados con CH_2Cl_2 a -20°C . Se añadió 1,21 mL de una solución de 0,22 M de cloruro de acrililo (2,0 equivalentes) en CH_2Cl_2 enfriada a -20°C , seguido de 0,8 mL de una solución de 0,5 M de Et_3N (3,0 equivalentes) en CH_2Cl_2 enfriada (-20°C). La resina se agitó durante 1 h a 25°C , se escurrió, y luego se volvió a tratar con cloruro de acrililo en las mismas condiciones. La resina se filtró y lavó con CH_2Cl_2 ($5 \times 2 \text{ mL}$), y luego se escurrió. La acrilamida obtenida fue tratada con una solución 2,0 M de la amina R^2NH_2 en isopropanol (12,0 equivalentes) durante 24 h a 50°C . Después de filtrar la resina, la reacción aza-Michael se repitió en las mismas condiciones. La resina se lavó con isopropanol ($5 \times 2 \text{ mL}$) antes de la síntesis submonómera de dos residuos α -peptoides.

Síntesis de residuos α -peptoides. A la resina se le añadieron 2,0 mL de una solución de 0,4 M de ácido bromoacético en DMF (6,0 equivalentes), seguido de 2,13 mL de una solución de 0,5 M de DIC en DMF (8,0 equivalentes). Después de agitarla durante 5 minutos a 25°C , la resina se escurrió y se lavó con DMF ($5 \times 2 \text{ mL}$). La bromoacetamida obtenida

se trató posteriormente con una solución 2,0 M de la amina R^3NH_2 (20,0 equivalente) en DMF y la mezcla se dejó en la plataforma de agitación durante 1 h a 40 °C. La resina se filtró y lavó con DMF (5 × 2 mL). Las dos últimas etapas de bromoacetilación y sustitución se reprodujeron en las mismas condiciones para construir el cuarto residuo con la cadena lateral R^4 deseada. El extremo N-terminal del peptómero fue acilado posteriormente según uno de los procedimientos generales descritos a continuación, antes de liberarlo de la resina.

Para la escisión, la resina se trató con 1,5 mL de una solución 2,4 M de HFIP en CH_2Cl_2 . Después de agitar durante 40 minutos a 25 °C, la resina se filtró y se lavó con CH_2Cl_2 (5 × 2 mL). El disolvente se eliminó a presión reducida. Finalmente, los grupos protectores sililados o Boc de las cadenas laterales se eliminaron mediante el tratamiento del peptómero con 2 mL de TFA al 25 % (v/v) en CH_2Cl_2 durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción que contenía el producto final se diluyó con CH_2Cl_2 (5 mL) antes de la evaporación completa al vacío. Para eliminar cualquier rastro de TFA, el producto disuelto en el CH_2Cl_2 se evaporó al vacío, repitiendo esta operación 5 veces.

Procedimientos generales para la acilación del extremo N-terminal del peptómero unido a la resina

Acetilación: A la resina se le añadió 1,56 mL de una solución de 1,7 M de anhídrido acético en DMF (20,0 equivalentes), seguido de 0,8 mL de una solución de 2,0 M de DIEA en DMF (12,0 equivalentes). Después de agitarla durante 90 minutos a 25 °C, la resina se filtró y se lavó con DMF (5 × 2 mL).

Benzoilación: A la resina se le añadió 0,8 mL de una solución de 1,0 M de cloruro de benzoilo en CH_2Cl_2 (6,0 equiv.), seguido de 0,8 mL de una solución de 2,0 M de DIEA en CH_2Cl_2 (12,0 equiv.). Después de agitarla durante 40 minutos a 25 °C, la resina fue escurrida y lavada con CH_2Cl_2 (5 × 2 mL).

Acilación a partir de ácidos carboxílicos: En una reacción de acoplamiento típica descrita aquí a partir del ácido fenilacético, se añadieron sucesivamente a la resina 2,0 mL de una solución de 0,4 M de ácido fenilacético en DMF (6,0 equivalentes) y 2,13 mL de una solución de 0,5 M de DIC (8,0 equivalentes) en DMF. Después de agitarla durante 1 h a 25 °C, la resina se escurrió y se lavó con DMF (5 × 2 mL).

Entre los compuestos (YC55, YC-60) que se sintetizaron, YC55 demostró una potencia igual a NUCC5953 para alterar la interacción TRIP8b-HCN (Tabla 1: IC₅₀ de los peptoides).

Tabla 1

	YC55	YC60	Acox3
IC ₅₀	8,862	12,71	0,6029

Se ha demostrado el efecto analgésico de los compuestos peptidomiméticos innovadores inyectados por vía intratecal o sistémica en el dolor neuropático agudo inducido por oxaliplatino en ratones.

Por lo tanto, el compuesto principal YC55 ha demostrado un efecto analgésico dependiente de la dosis en ratones OIPN cuando se administra por vía i.t. (Figura 9).

El compuesto YC55 también ha demostrado un efecto analgésico dependiente de la dosis en ratones OIPN cuando se administra por vía s.c. (Figura 10).

No se observó ninguna alteración de la actividad locomotora en la prueba del cilindro giratorio cuando los ratones fueron tratados con YC55 administrado por vía subcutánea (Figura 11).

El YC55 también demostró un efecto analgésico dependiente de la dosis en un modelo de rata de neuropatía inducida por paclitaxel cuando se administró por vía i.t. (Figura 12).

La administración intratecal de YC55 mostró un efecto antihiperálgico en un modelo de neuropatía inducida por lesión traumática del nervio ciático (Figura 13), lo que sugiere que la estrategia de alteración de la interacción TRIP8b podría tener un efecto analgésico en varios estados de dolor neuropático.

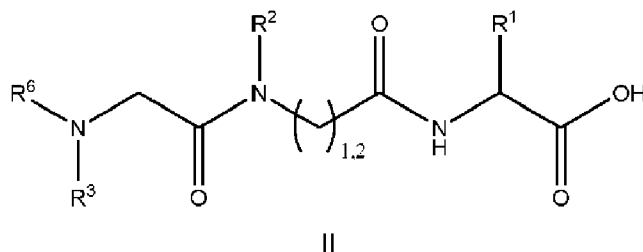
Los compuestos MP208, MP405 (5 µg, i.t.) y MP341, MP354, MP376 (10 mg/kg, s.c.) demostraron un efecto analgésico en un modelo de neuropatía inducida por oxaliplatino en ratones (Figura 14 y Figura 15, respectivamente).

Asimismo, los compuestos LF108, LF306, LF188 (Figura 16), LF400, LF329, y LF295 (Figura 17), LF275, LF261 y LF126 (Figura 18), LF239, LF222 y LF176 (Figura 19), demostraron un efecto analgésico (5 µg, i.t.) en un modelo de neuropatía aguda inducida por oxaliplatino en ratones.

B- Peptidomiméticos triméricos

Los compuestos peptómeros triméricos también son imitadores de la secuencia del extremo carboxi-terminal del canal HCN₂. Han sido diseñados basándose en el estudio exhaustivo de la estructura de rayos X de un cocrystal de TRIP8b con la región C-terminal de HCN₂ (pdb: 4EQF).

Estos ligandos tienen una fórmula que está representada por la fórmula LF369 mostrada a continuación o la fórmula general (II) siguiente:



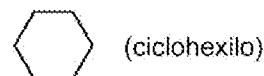
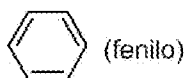
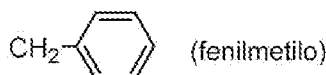
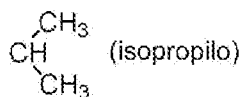
donde

R¹, **R²** y **R³** son como se definieron anteriormente;

R⁶ es H, **R³**, COR⁵ (donde **R⁵** es como se definió anteriormente), o **R⁷**;

R⁷ es independientemente un grupo entre:

(CH₂)_w alquilo (w = 1-4)



Los compuestos son oligómeros híbridos péptido-peptóide (peptómeros) (Ostergaard y col., 1997) [17]. Comprenden tres unidades de las cuales un α-aminoácido está situado en el extremo C-terminal de la secuencia, seguido de dos residuos peptóides.

Las síntesis se realizaron en solución a partir de un α-aminoácido protegido en forma de éster de *tert*-butilo (Xaa-*t*Bu, la L-Leu-*t*Bu en el caso de la síntesis de LF369). Estas síntesis también se pueden hacer en resina como se describió anteriormente para los peptidomiméticos tetraméricos. A partir de esta unidad, la elongación se realizó como para las moléculas que responden a la fórmula general (I), mediante enfoques de “química de submonómeros”. Cuando la unidad central es de tipo β-peptóide, las dos etapas necesarias para su construcción son la reacción de Xaa-*t*Bu con cloruro de acrililo, seguida de una reacción aza-Michael, que permite introducir la cadena lateral deseada (**R²**) en el esqueleto. La tercera unidad α-peptóide se construye por acilación del dímero con el bromuro del ácido bromoacético, seguido de la sustitución del átomo de bromo por una amina. En el caso de que **R⁶** sea H, la amina utilizada es una amina primaria **R³NH₂**. Cuando **R⁶** es COR⁵, la amina secundaria obtenida después del tratamiento con **R³NH₂** es acilada por un cloruro de ácido, un anhídrido de ácido o un ácido carboxílico en condiciones de acoplamiento. Los compuestos para los que **R⁶** = **R⁷** se obtienen tratando los dímeros bromoacetilados en el extremo N-terminal con una amina secundaria **R³R⁷NH**. También se pueden obtener por aminación reductora de compuestos cuyo extremo N-terminal es NHR³. La etapa final consiste en desproteger las cadenas laterales y el extremo C-terminal mediante un tratamiento con TFA.

El protocolo experimental preciso para la síntesis de LF369 es el siguiente:

En un matraz, la L-leu-*t*Bu (1,74 g, 7,8 mmol) se disuelve en 45 mL de THF anhidro. El matraz en atmósfera inerte de argón se enfría a 0 °C. Se añade trietilamina (2,3 mL, 31,4 mmol, 4 equiv.), seguido de cloruro de acrililo (0,76 mL, 9,4 mmol, 1,2 equiv.). Después de 3 horas de agitación a 0 °C, una cromatografía de película fina (50/50 ciclohexano/AcOEt) indica una conversión total. Las sales formadas se eliminan por filtración, el filtrado se evapora al vacío, y el producto obtenido se purifica por cromatografía en gel de sílice (50/50 ciclohexano/AcOEt). La acrilamida se aísla con un rendimiento del 93 % (1,76 g, 7,27 mmol) en forma de sólido blanco.

Reacción aza-Michael. La acrilamida formada previamente (1,76 g, 7,27 mmol) se disuelve en 20 mL de etanol. Se añade la etanolamina, cuya función de alcohol se ha protegido en forma de éter de *tert*butildimetilsililo (2,68 g, 15,28 mmol, 2,1 equiv.), y la mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 60 h. El disolvente se evapora y el bruto de reacción se purifica mediante cromatografía en gel de sílice (90/10/0,1 AcOEt/MeOH/Et₃N), lo que permite obtener el dímero con un rendimiento del 90 % (2,74 g, 6,58 mmol) en forma de aceite amarillento.

Reacción de acilación del dímero. El dímero (2,74 g, 6,58 mmol) se disuelve en 10 mL de THF, el reactor es inerte al argón, y luego se enfría a -20 °C. Se añade trietilamina (1,1 mL, 7,89 mmol, 1,2 equiv.) a la solución, seguido de la adición de bromuro de 2-bromoacetilo (0,62 mL, 7,89 mmol, 1,2 equiv.). Después de 3 horas de agitación a -20 °C, se filtra la mezcla de reacción. El filtrado obtenido se evapora y el bruto de reacción es cromatografiado en gel de sílice (60/40/0,1 Ciclohexano/AcOEt/Et₃N). El dímero bromoacetilado se aísla puro con un rendimiento del 67 % (2,36 g, 4,4 mmol) en forma de aceite amarillento.

Reacción de sustitución. El producto previamente obtenido (2,36 g, 4,4 mmol) se disuelve en 10 mL de THF. A la solución se añade trietilamina (1,2 mL, 8,8 mmol, 2 equiv.) y etanolamina protegida H₂NCH₂CH₂ OTBDMS (2,31 g, 13,2 mmol, 3 equiv.). El medio de reacción en atmósfera de argón se agita durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtra y el filtrado obtenido se evapora. El producto bruto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice (95/5/0,1 AcOEt/MeOH/Et₃N) produciendo el trímero con un rendimiento del 83 % (2,30 g, 3,64 mmol) en forma de aceite.

Acetilación del trímero. La amina obtenida (2,3 g, 3,64 mmol) se disuelve en 20 mL de acetato de etilo. A la solución se añade trietilamina (2,02 mL, 14,5 mmol, 4 equiv.) y luego anhídrido acético (2,75 mL, 29 mmol, 8 equiv.). La reacción se pone bajo argón, a temperatura ambiente durante 60 h. Después de la evaporación del disolvente, el bruto obtenido es cromatografiado en gel de sílice (90/10/0,1 AcOEt/ciclohexano/Et₃N) produciendo el trímero N-acetilado con un rendimiento del 92 % (2,27 g, 3,36 mmol) en forma de aceite incoloro.

Detección de las cadenas laterales y del extremo C-terminal. El compuesto trimérico (502 mg, 0,776 mmol, 1 equiv.) se disuelve en 4 mL de una mezcla TFA/ CH₂Cl₂/H₂O (47,5: 47,5: 5). Después de 2 horas de agitación a temperatura ambiente, se añaden 10 mL de diclorometano. El medio de reacción se evapora al vacío, y luego se realizan 5 coevaporaciones con diclorometano. El producto se vuelve a disolver en 5 mL de agua destilada y se deja agitar a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se evapora, y luego se realizan cinco coevaporaciones de tolueno que producen LF369 (362 mg) en forma de aceite.

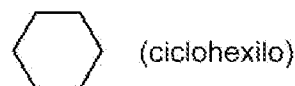
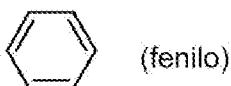
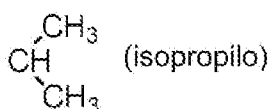
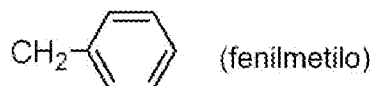
Cadenas laterales

R¹, R² y R³ son como se definieron anteriormente;

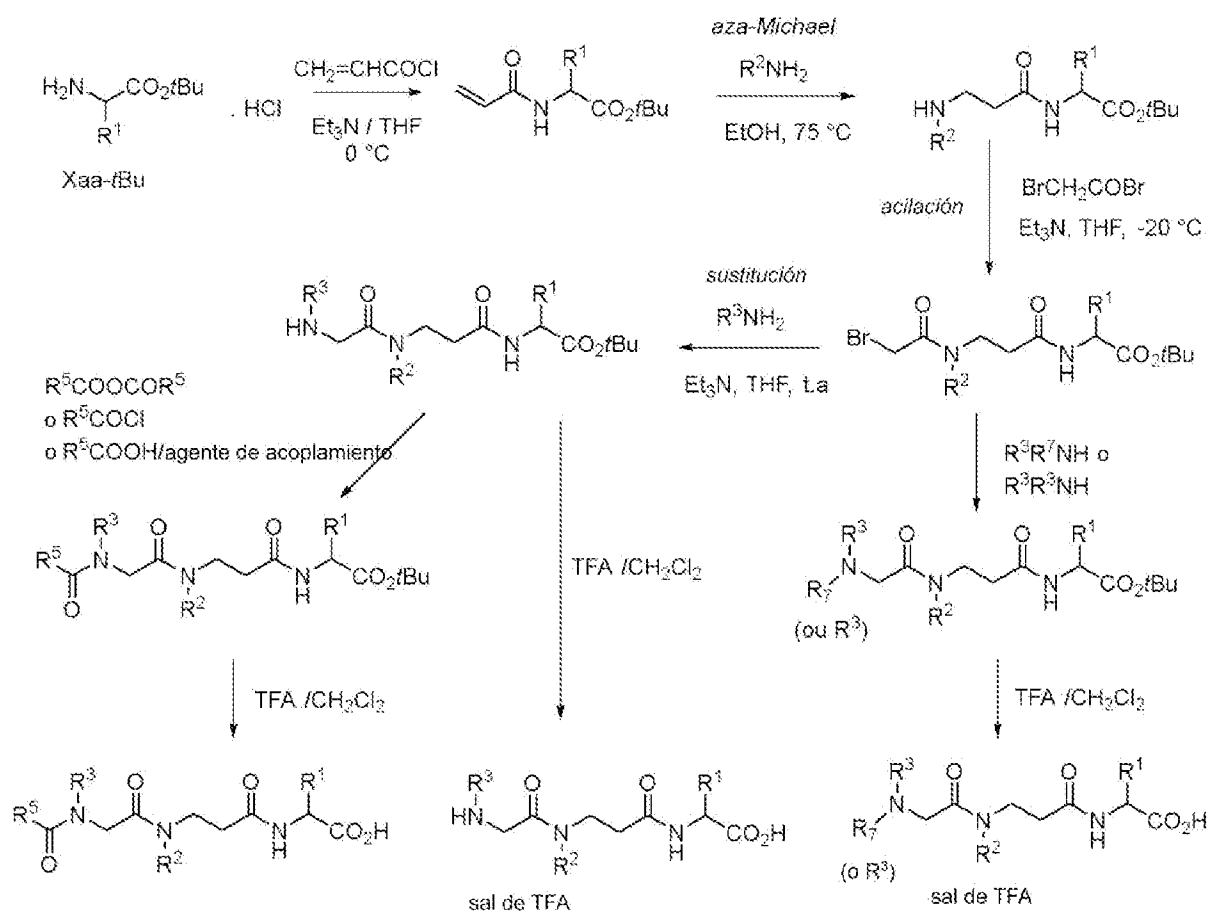
R⁶ es R³, H, COR⁵ (donde R⁵ es como se definió anteriormente), o R⁷;

R⁷ es independientemente un grupo entre:

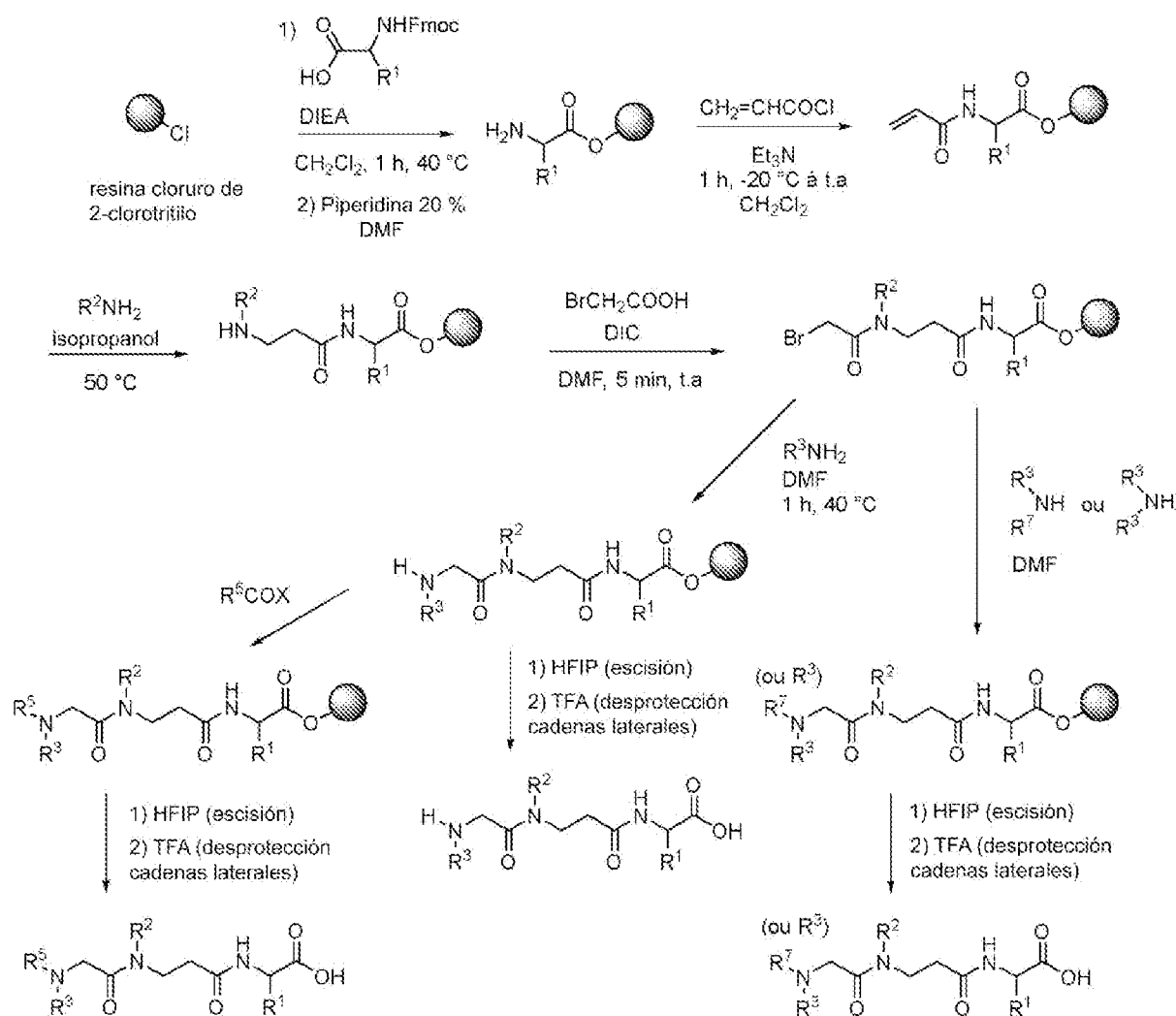
(CH₂)_wCH₃ alquilo (w = 1-4)



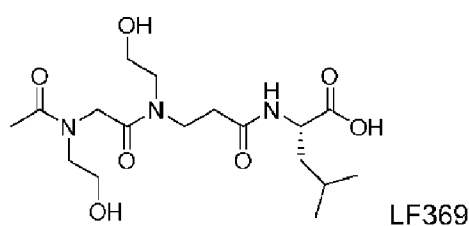
Esquema sintético representativo de la síntesis en solución de peptoides de fórmula general (II), p. ej., LF369



Esquema sintético representativo de la síntesis soportada de peptoides de fórmula general (II), p. ej., LF369



Molécula sintetizada



Síntesis

El compuesto LF369 (5 µg, i.t.) demostró un efecto analgésico en un modelo de neuropatía inducida por oxaliplatino en ratones (Figura 20).

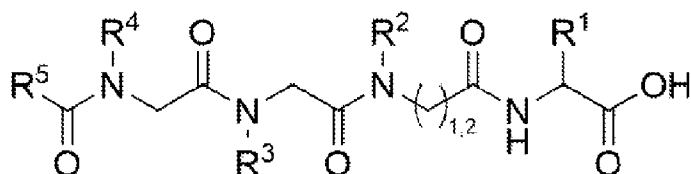
Lista de referencias

1. Finnerup y col., Lancet Neurol., 14(2): 162-173, 2015
2. von Hehn y col., Neuron, 73(4): 638-652, 2012
3. Hershman y col., J. Clin. Oncol., 32(18): 1941-1967, 2014
4. Ludwig y col., Nature, 393(6685): 587-591, 1998
5. Santoro y col., Cell, 93(5): 717-729, 1998

6. Seifert y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96(16): 9391-9396, 1999
7. Dunlop y col., Curr. Pharm. Des., 15(15): 1767-1772, 2009
8. Lewis y col., Mol. Cell Neurosci., 46(2): 357-367, 2011
9. Descoeur y col., EMBO Mol. Med., 3(5): 266-278, 2011
10. Young y col., Pain, 155(9): 1708-1719, 2014
11. Lewis y col., J. Neurosci., 29(19): 6250-6265, 2009
12. Bankston y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 109: 7899, 2012
13. Han y col., J. Biomol. Screen, 20(9): 1-8, 2015
14. Janssen y col., Arzneimittelforschung, 13: 502-507, 1963
15. Randall y Selitto, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 111(4): 409-419, 1957
16. Kim y Chung, Pain, 50(3): 355-363, 1992
17. Ostergaard y col., Molecular Diversity, 3: 17-27, 1997(
18. Simon y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 9367-9371, 1992
19. Hamper y col., J. Org. Chem., 63: 708-718, 1998
20. Zuckermann y col., J. Am. Chem. Soc., 114: 10646-10647, 1992
21. Culf y col., Molecules, 15: 5282-5335, 2010
22. Miller y col., Drug Dev. Res., 35: 20-32, 1995
23. Kwon y col., J. Am. Chem. Soc., 129: 1508-1509, 2007
24. Vollrath y col., Organic & Biomolecular Chemistry, 11: 8497-8201, 2013
25. Li y col., Cellular & Molecular Immunol., 7: 133-142, 2010
26. Chongsiriwatana y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105: 2794-2799, 2008
27. Mesirca y col., Nat. Commun., 5: 4664.doi:10.1038/ncomms5664, 2014
28. Marger y col., Channels (Austin), 5(3): 241-250, 2011
29. Hruby, Peptides, 116: 63-67, 2019
30. Solicitud de patente EP 2289886

REIVINDICACIONES

1. Peptoide de la siguiente fórmula general (I):



I

donde

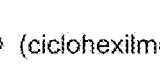
R^1 es independientemente CH_3 (L-Ala), $CH(CH_3)_2$ (L-Val), $CH(CH_3)CH_2CH_3$ (L-Ile), $CH_2CH(CH_3)_2$ (L-Leu y D-Leu), $CH_2C(CH_3)_3$, $C(CH_3)_3$, CH_2 (ciclobutilo);

R^2 y R^3 se eligen de forma independiente entre: $CH_2CH(CH_3)_2$, $CH_2CH_2NH_2$, CH_2CH_2OH , $CH_2CH_2CH_2OH$, $CH_2CH(OH)CH_3$, CH_2CONH_2 , $CH_2CH_2CONH_2$;

R^4 es un grupo alifático o aromático elegido entre:

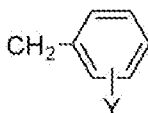
$CH_2CH(CH_3)_2$ (isobutilo)

$CH_2C(CH_3)_3$ (neopentilo)

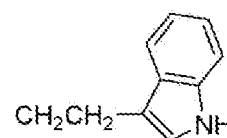
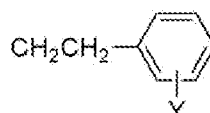
CH_2 - (ciclohexilmetilo)

 (isopropilo)

$CH_2CH_2CH_2CH_3$ (*n*-butilo)



$Y = H, OMe, CF_3$



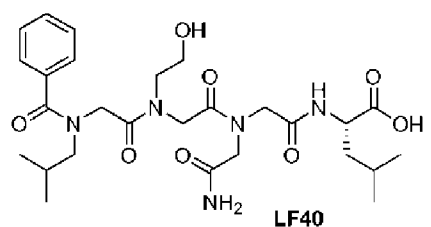
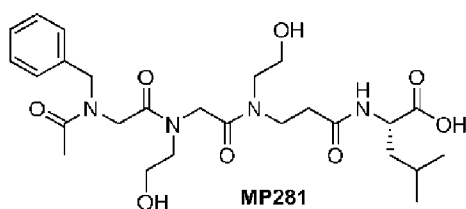
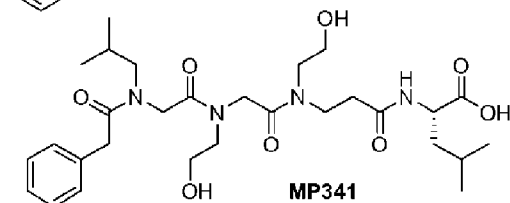
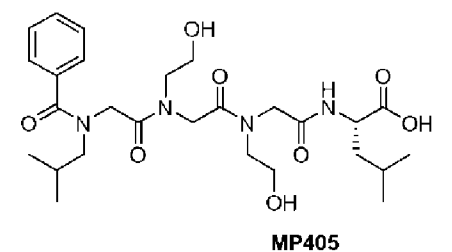
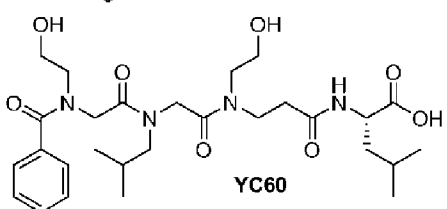
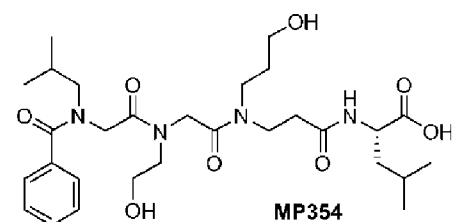
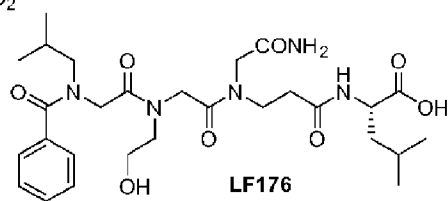
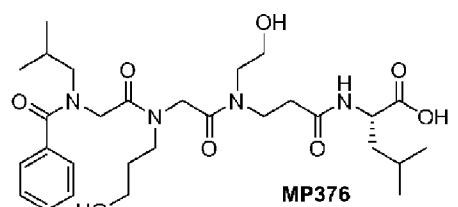
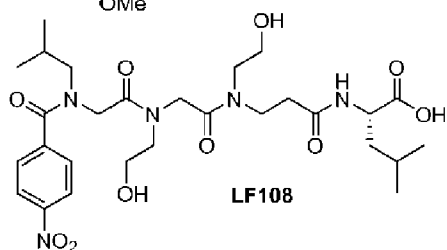
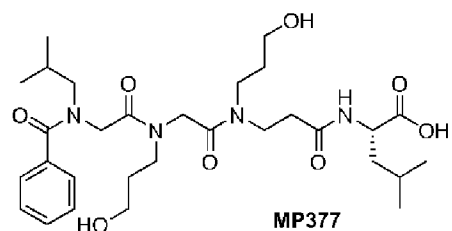
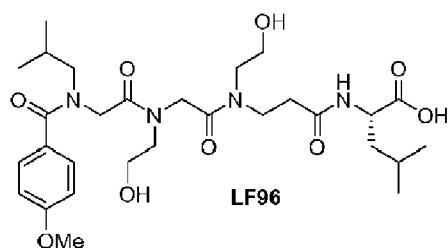
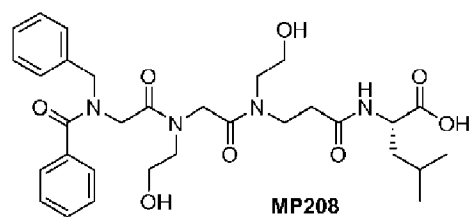
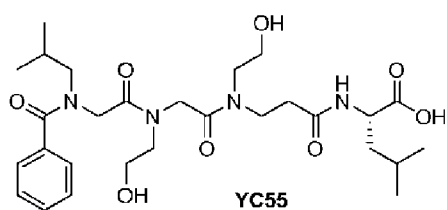
$(CH_2)_n-Z$

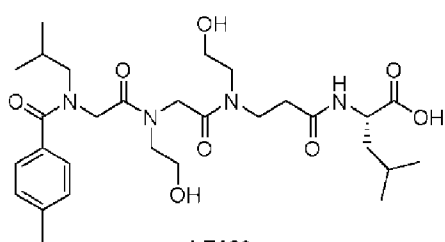
$n = 2 \text{ à } 8$

$Z = OH, NH_2, COOH, SH, N_3, C\equiv CH$

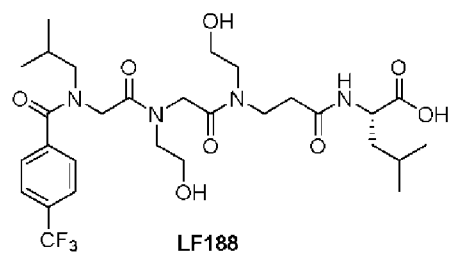
R^5 es independientemente CH_3 , $CH(CH_3)_2$, $CH_2C_6H_5$, C_6H_4X (donde X en posición orto, meta o para es independientemente H, OMe, CF_3 , CH_3 , CH_2CH_3 , F, Br, Cl, NO_2), 3-indolilo, 3-quinolinilo.

2. Peptoide según la reivindicación 1, de las siguientes fórmulas:

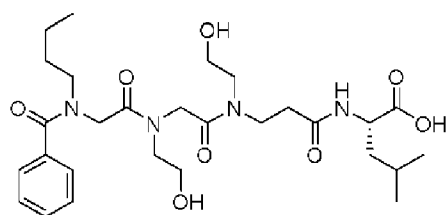




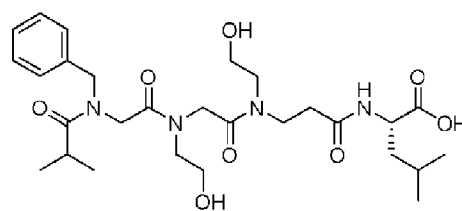
LF126



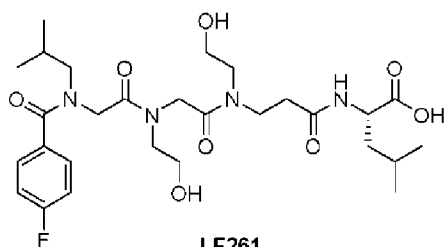
LF188



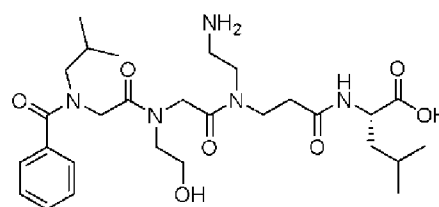
LF222



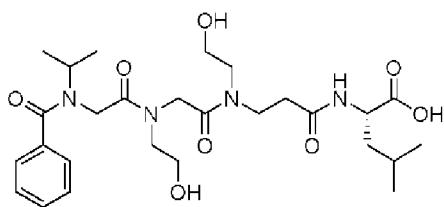
LF239



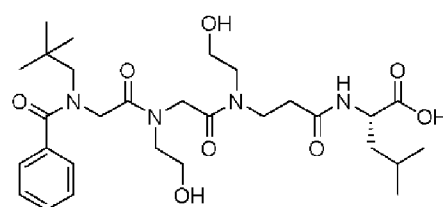
LF261



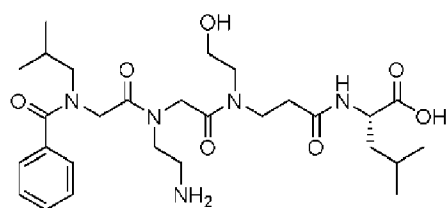
LF275



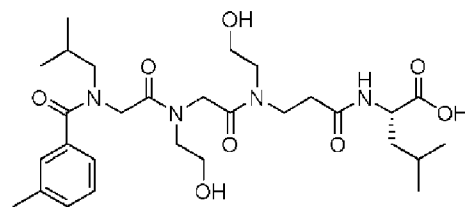
LF295



LF306

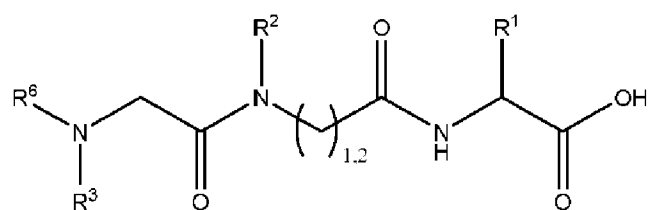


LF329



LF400

3. Peptide de la siguiente fórmula general (II):

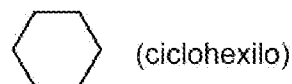
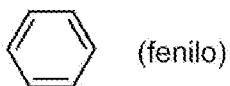
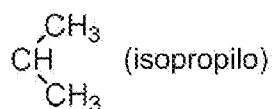
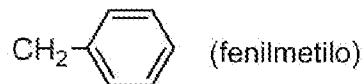


II

donde

R^1 , R^2 y R^3 son como se definieron en la reivindicación 1;
 R^6 es R^3 , H, COR^5 (donde R^5 es como se definió anteriormente) o R^7 ;
 R^7 es independientemente un grupo entre:

$(CH_2)_wCH_3$ alquilo ($w = 1-4$)



4. Composición farmacéutica que comprende un peptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. Peptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica según la reivindicación 4, para un uso como medicamento.
6. Peptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o composición farmacéutica según la reivindicación 4, para un uso en la prevención o el tratamiento del dolor crónico.
7. Peptido para un uso según la reivindicación 6, donde el dolor crónico es de origen neuropático.

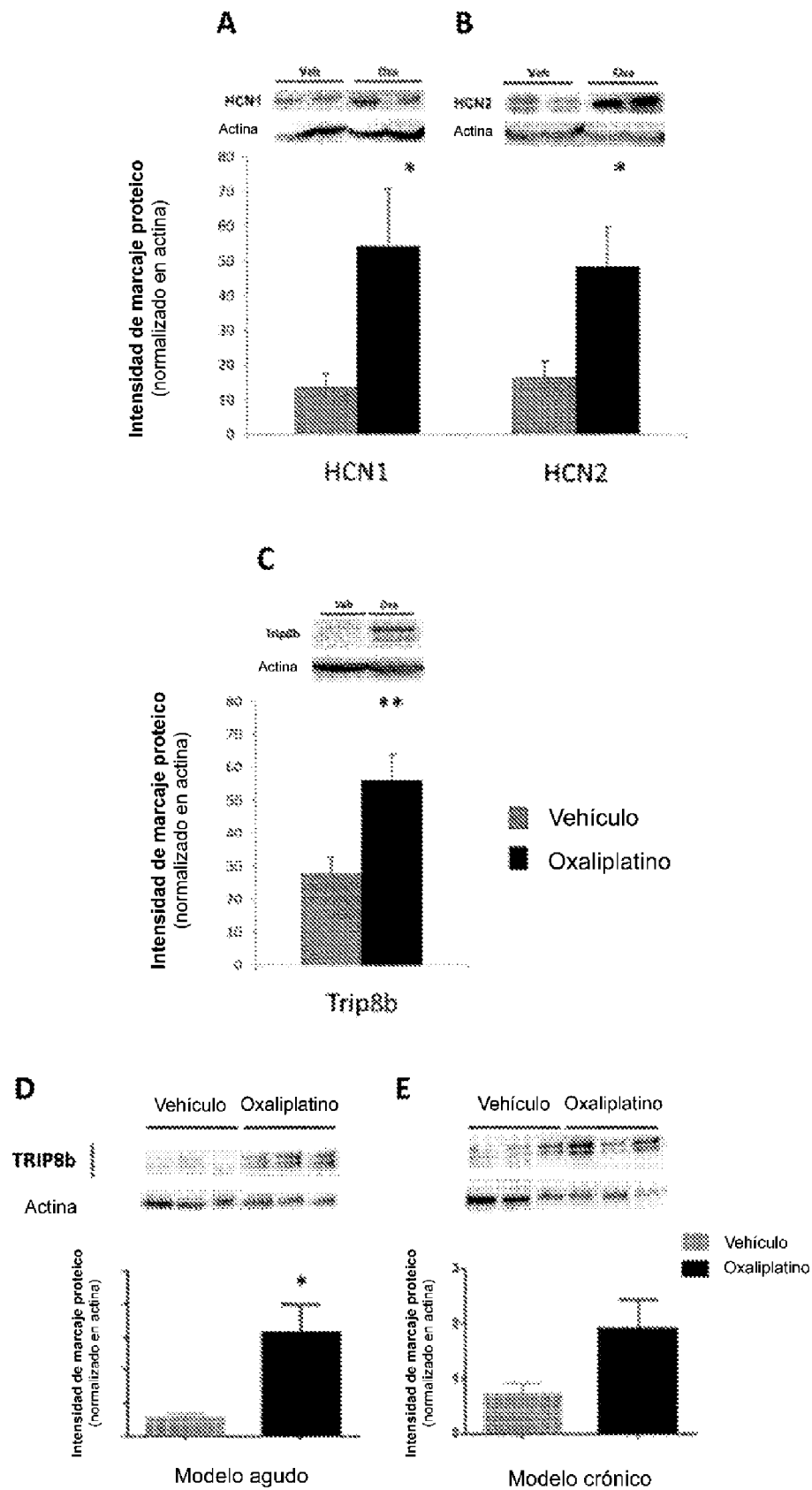


Figura 1

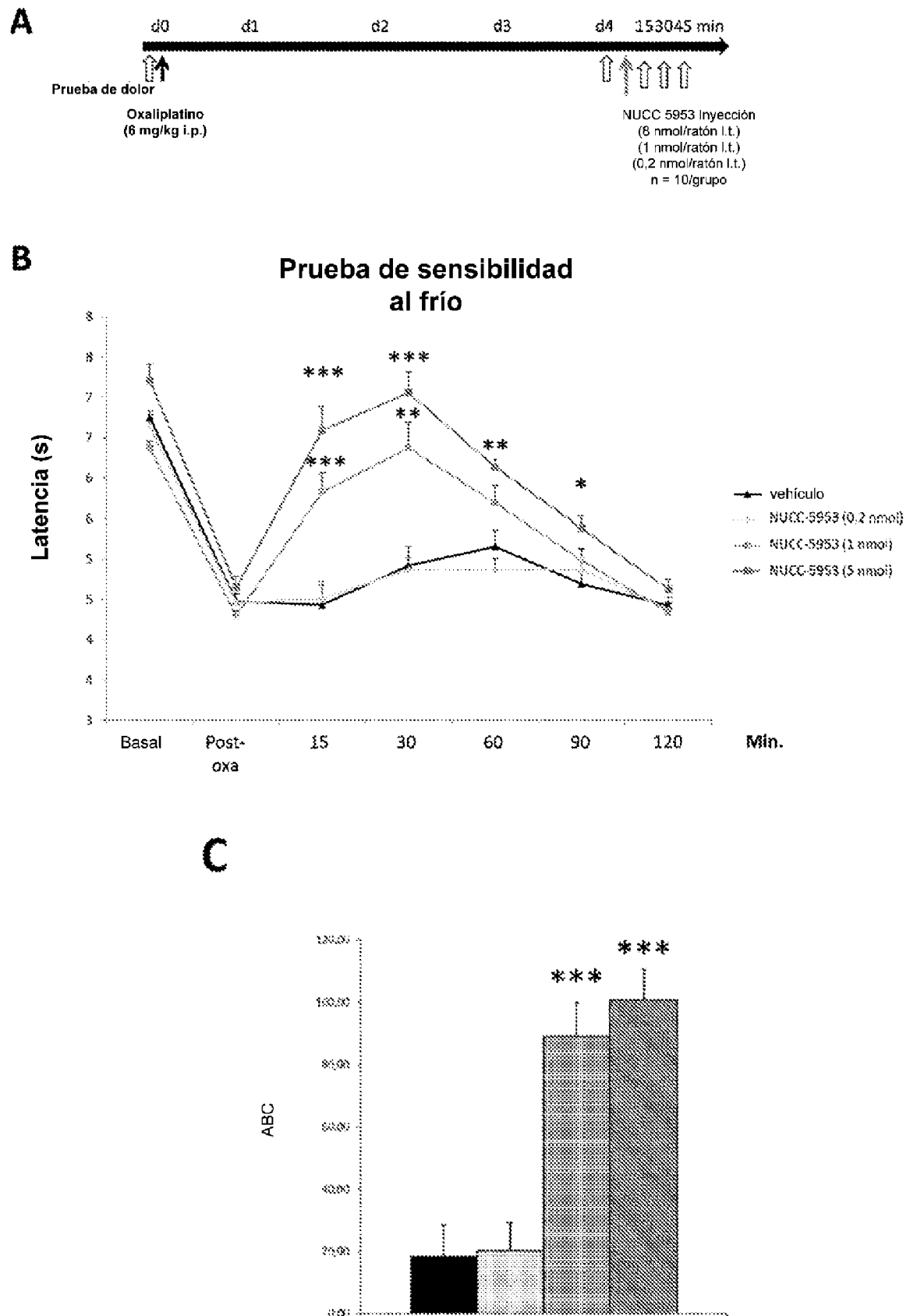


Figura 2

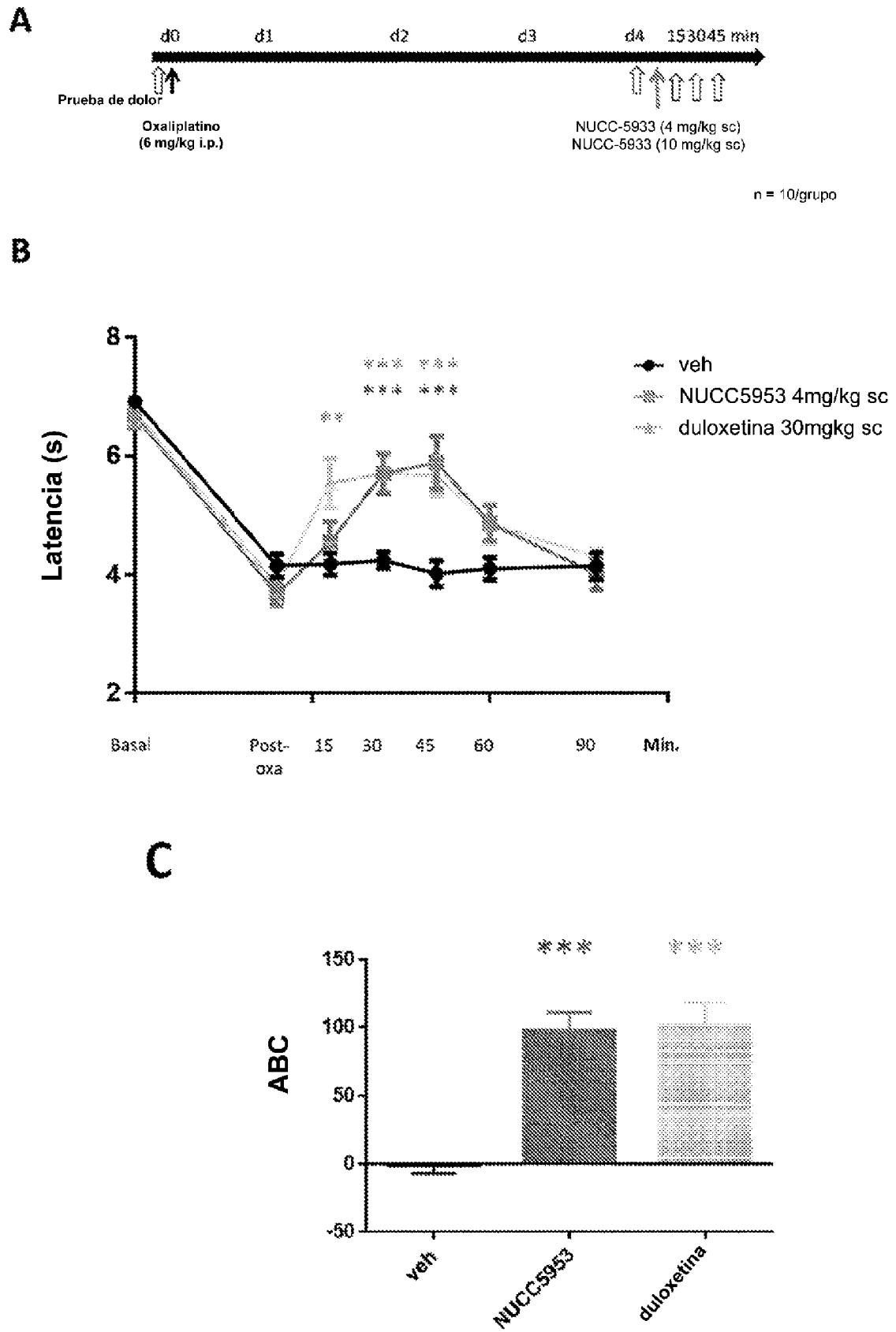
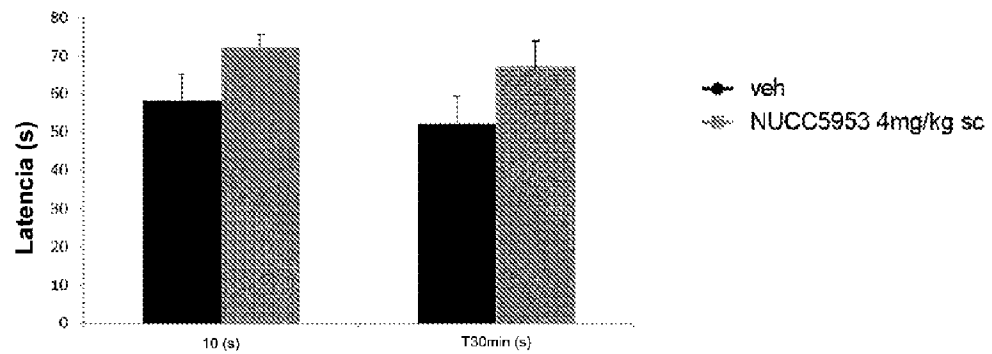


Figura 3

A



B

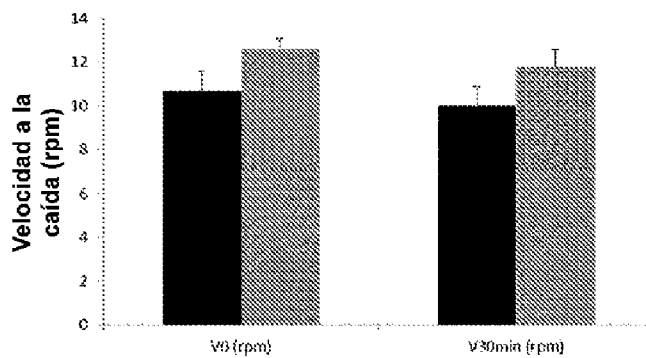
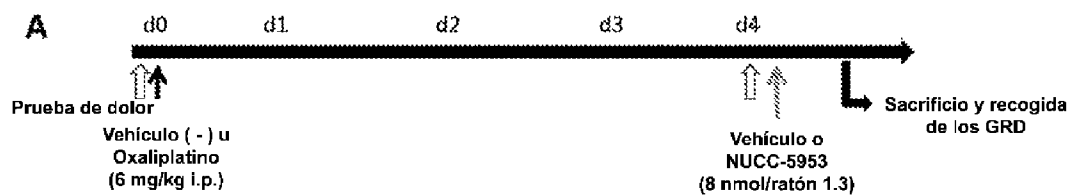


Figura 4



B

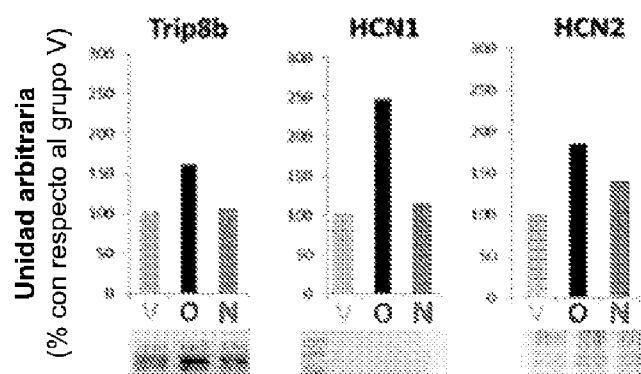


Figura 5

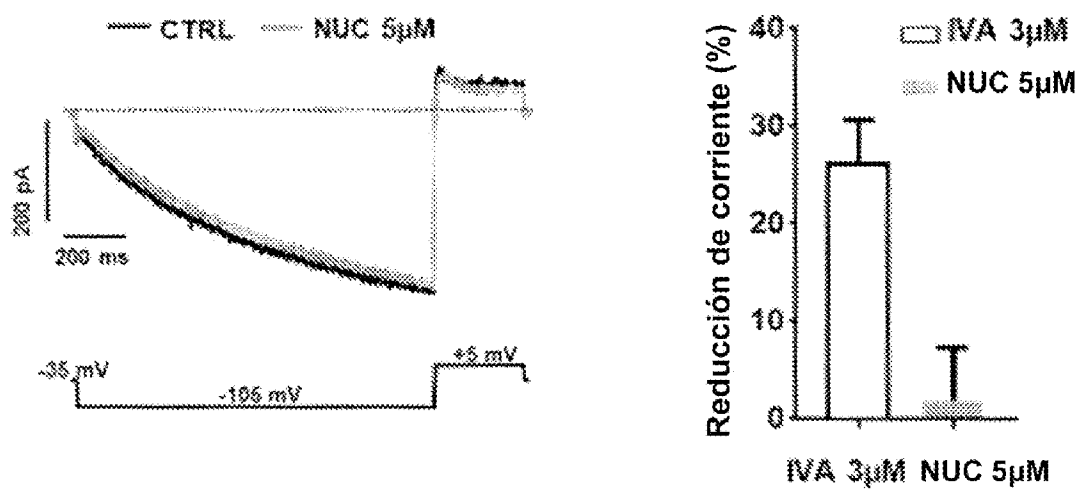


Figura 6

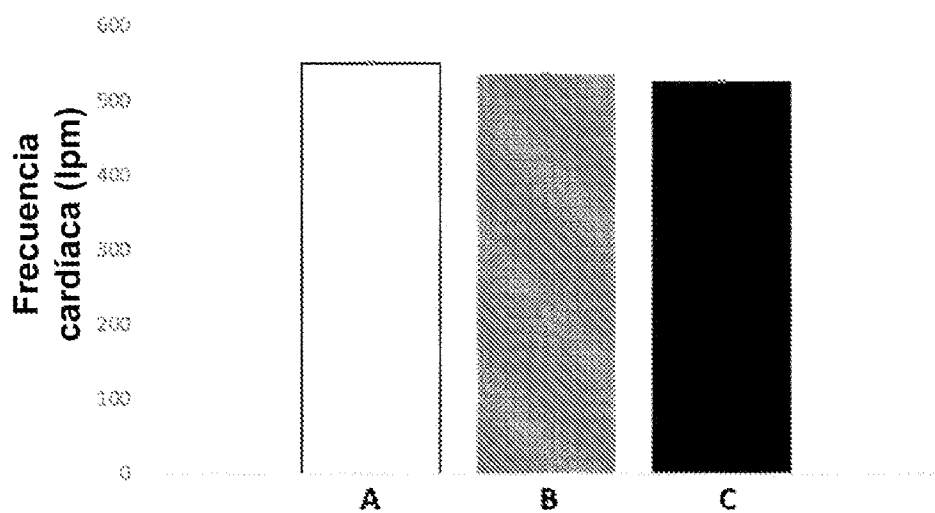


Figura 7

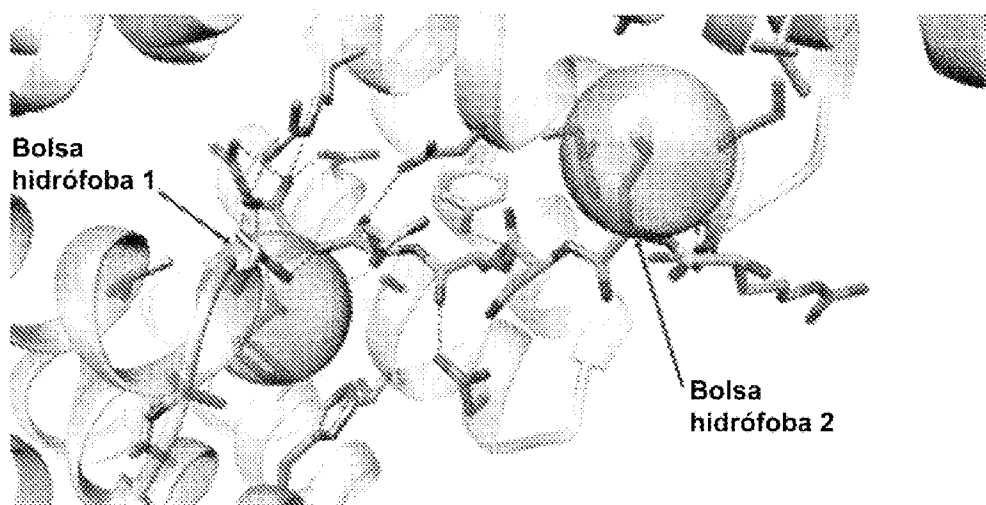


Figura 8

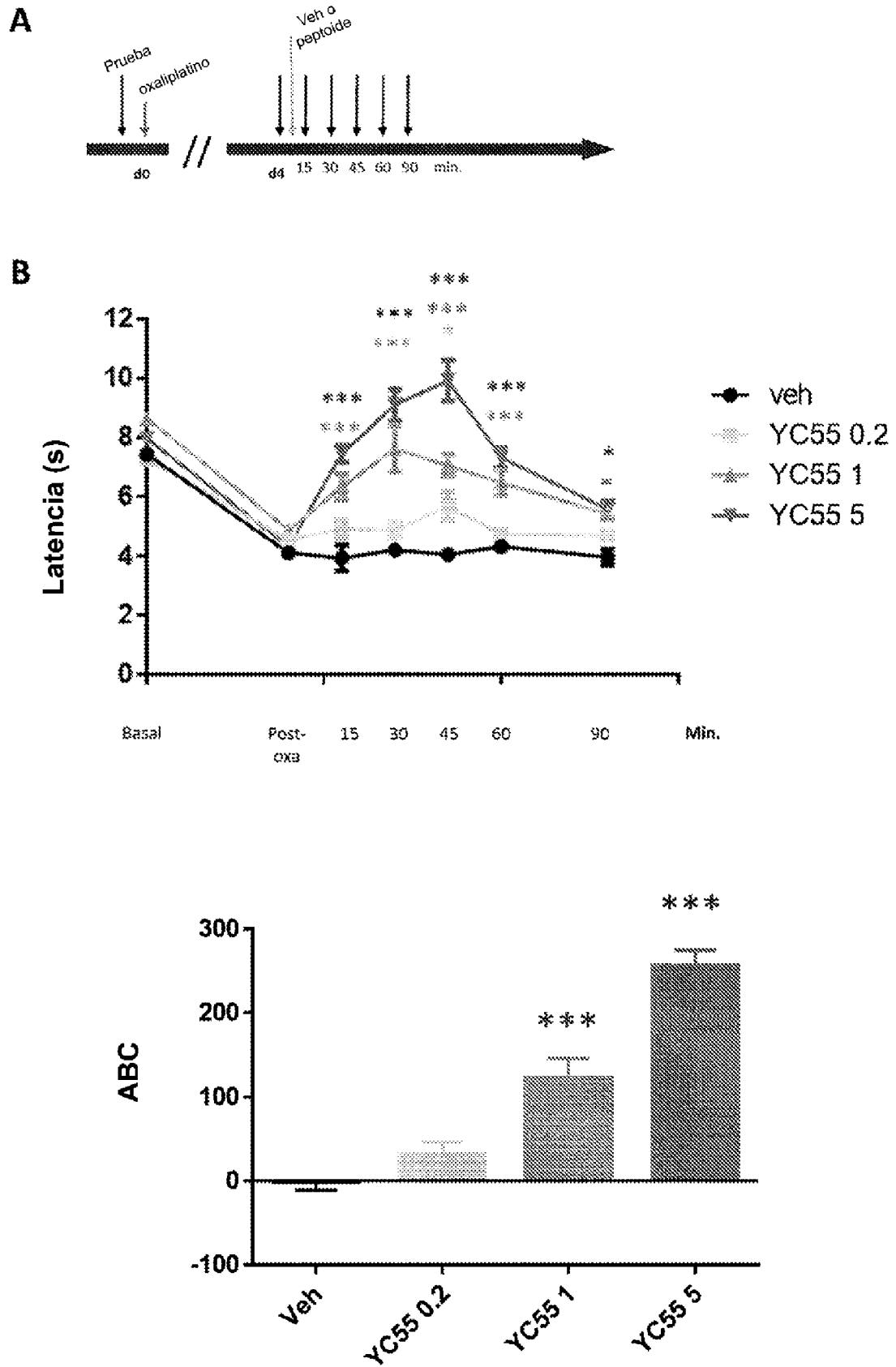


Figura 9

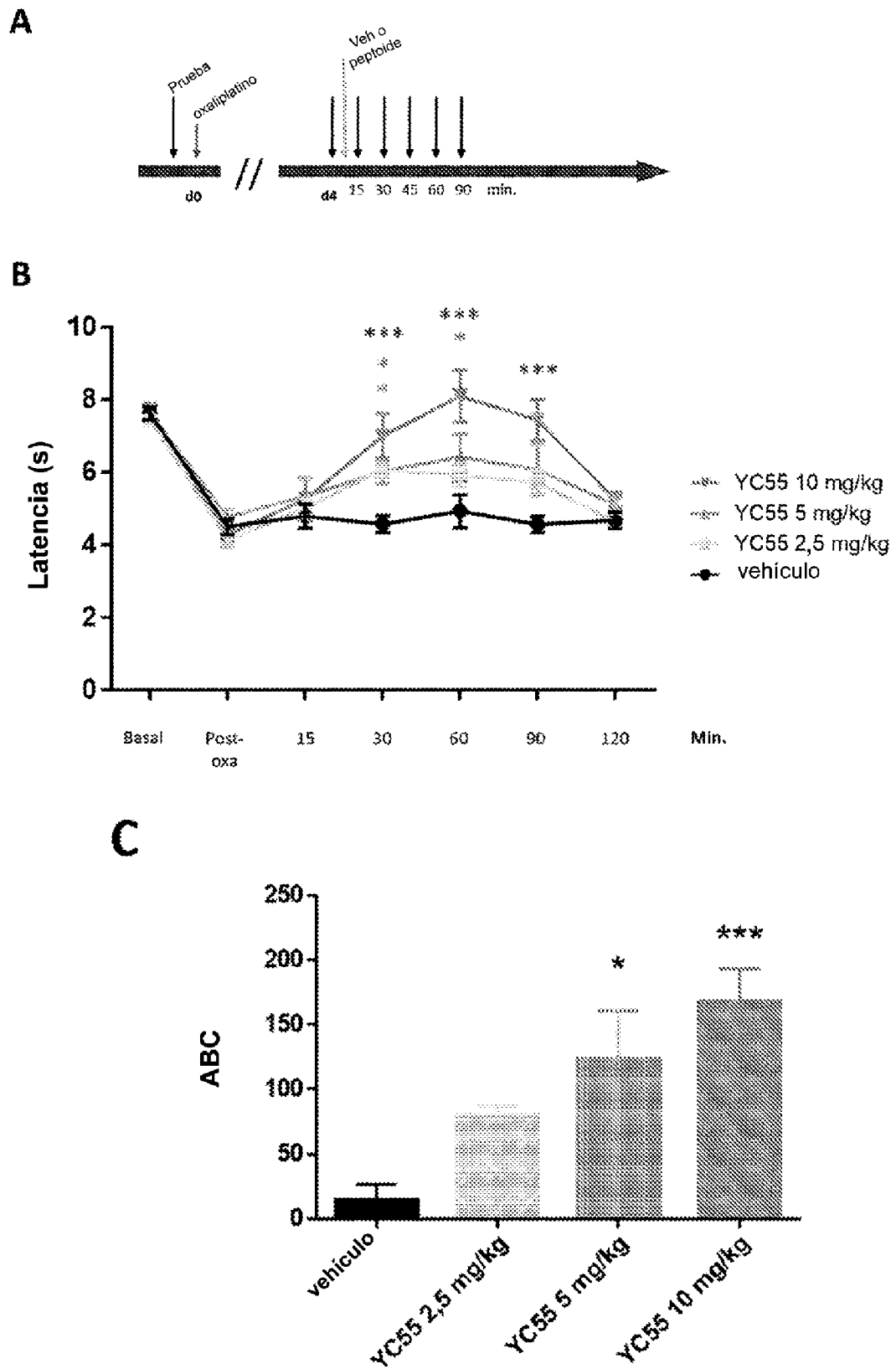


Figura 10

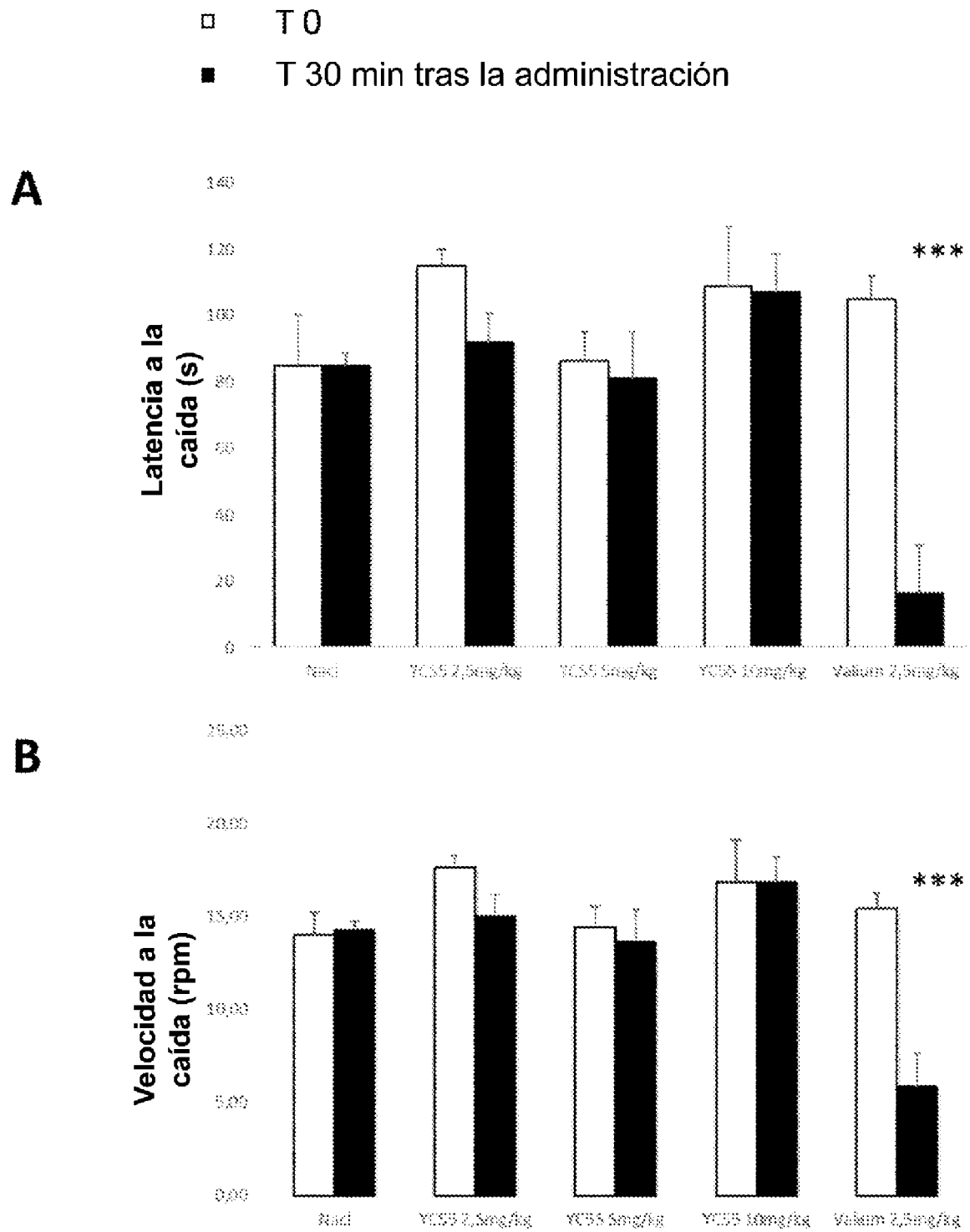
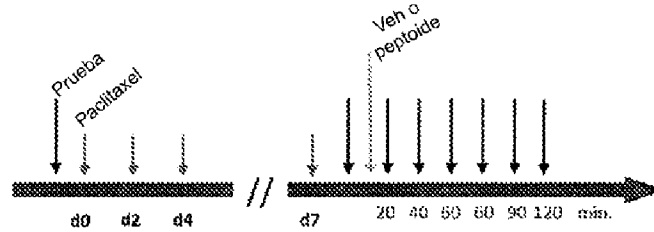
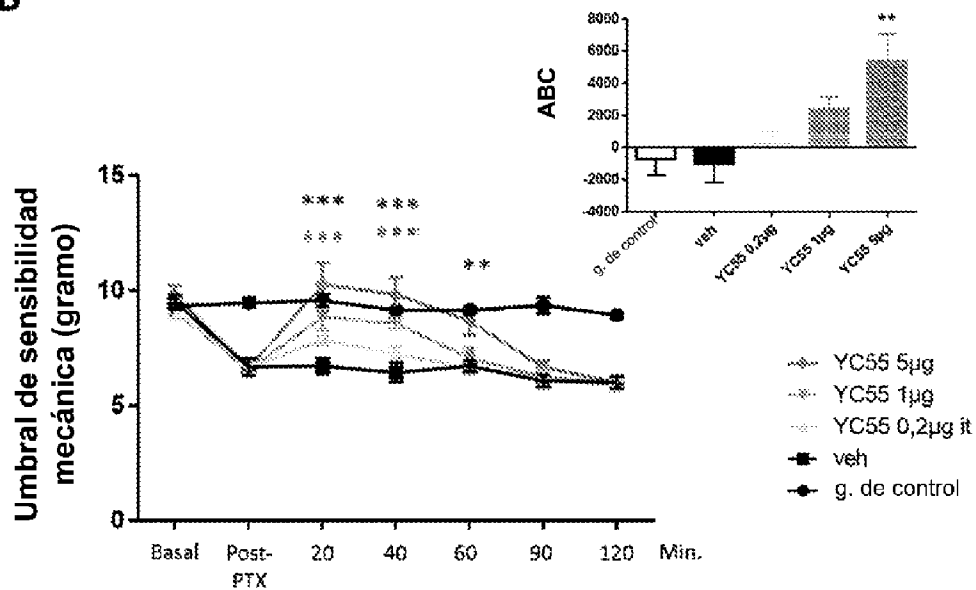


Figura 11

A



B



C

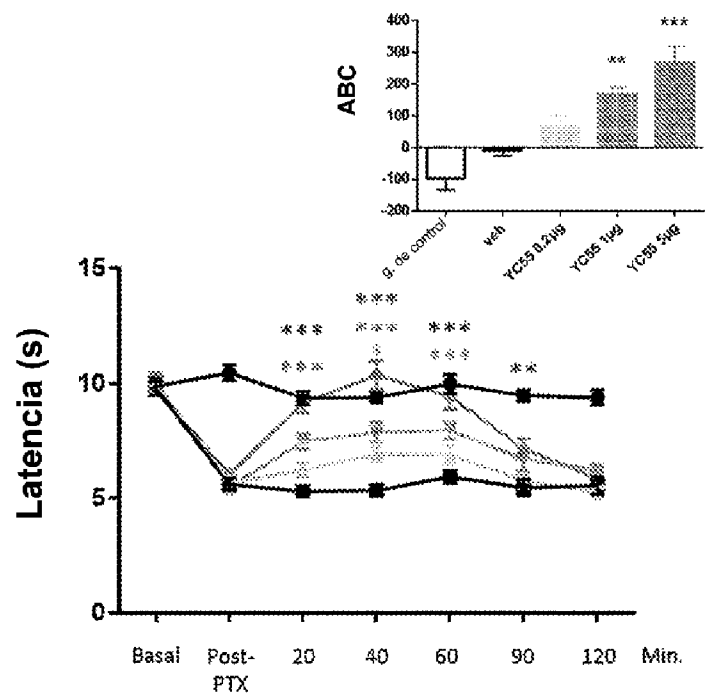
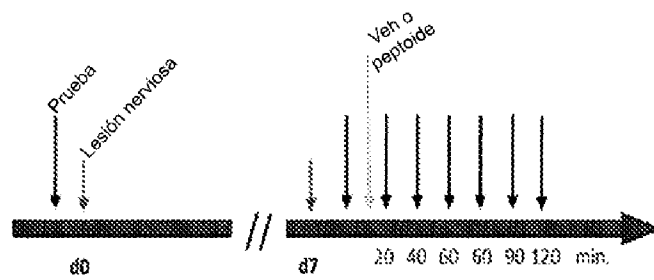


Figura 12

A



B

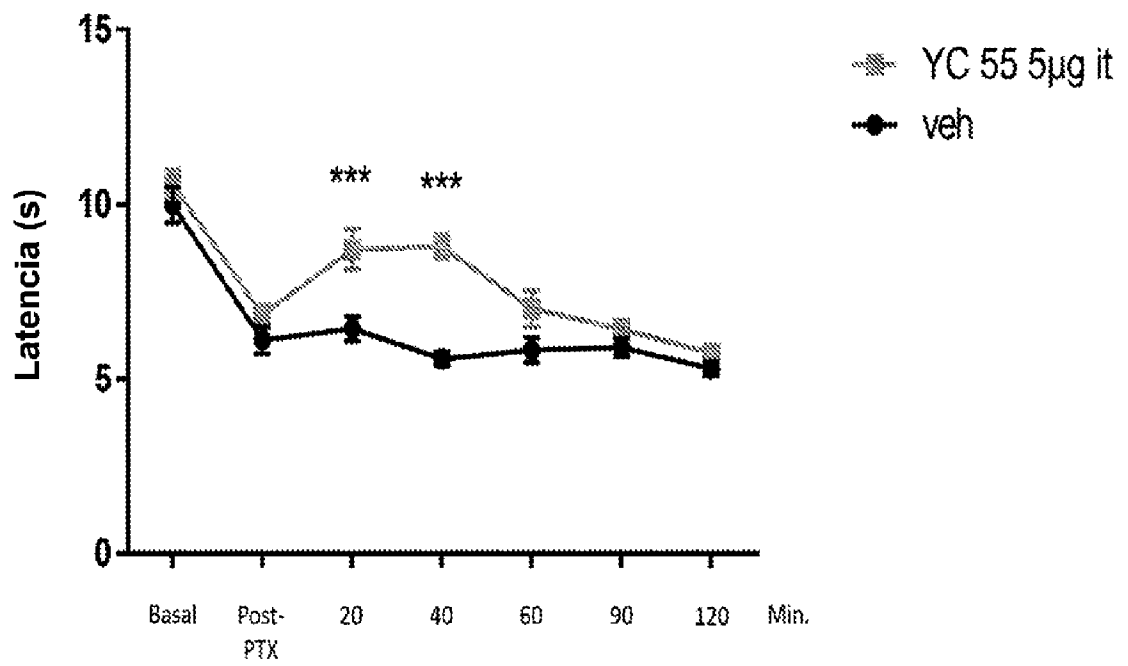
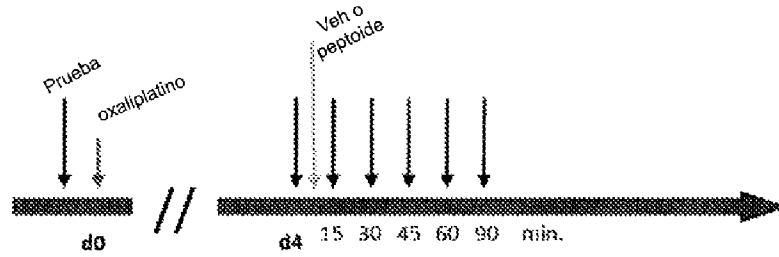
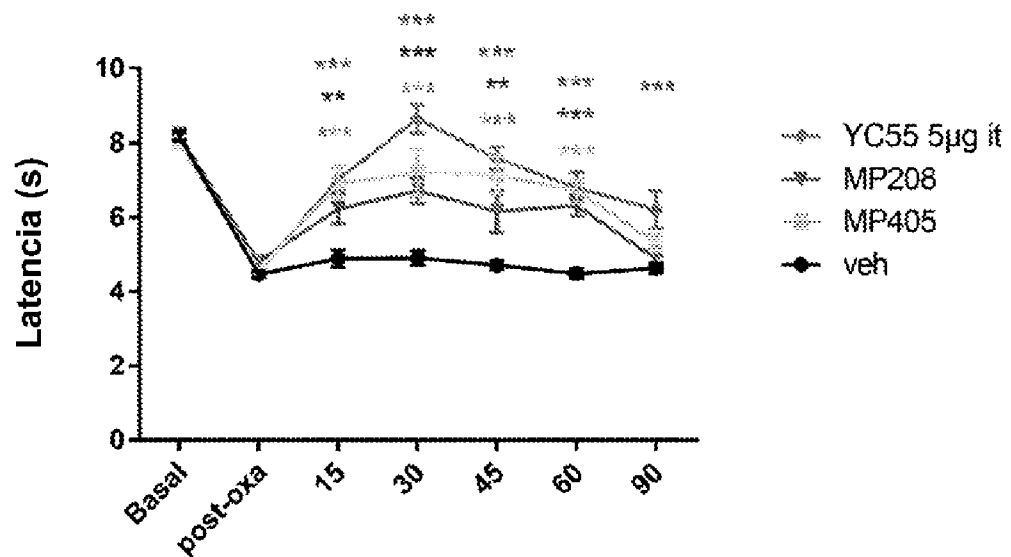


Figura 13

A



B



C

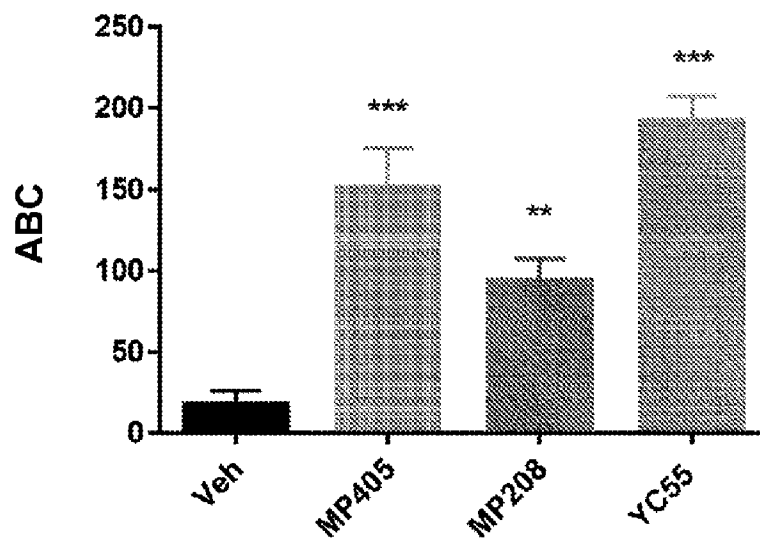
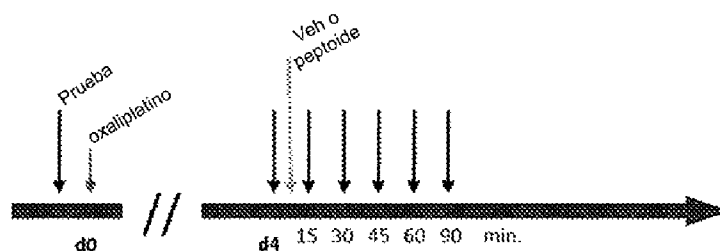
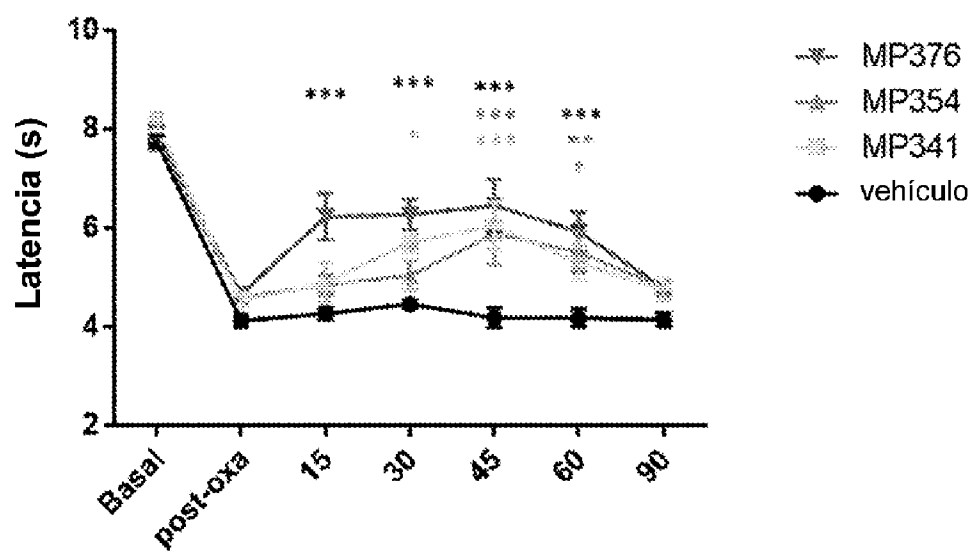


Figura 14

A



B



C

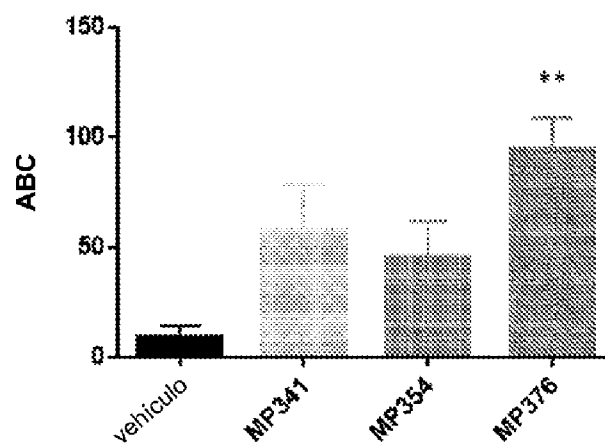
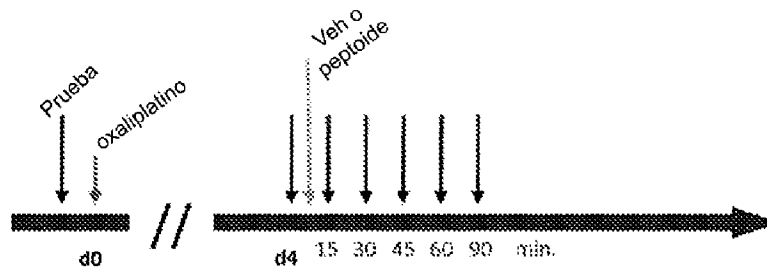
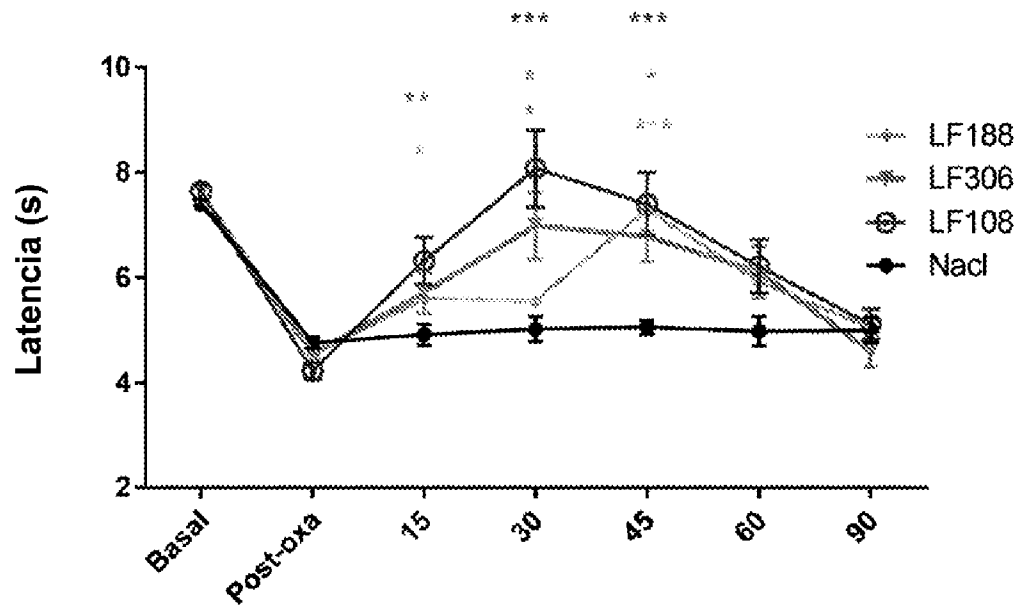


Figura 15

A



B



C

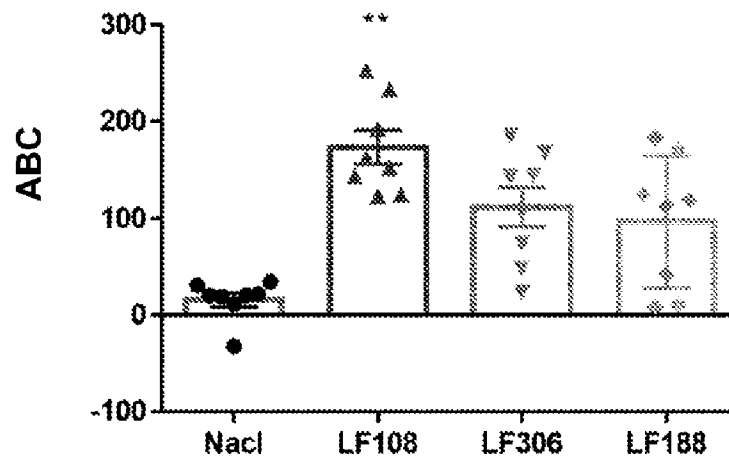
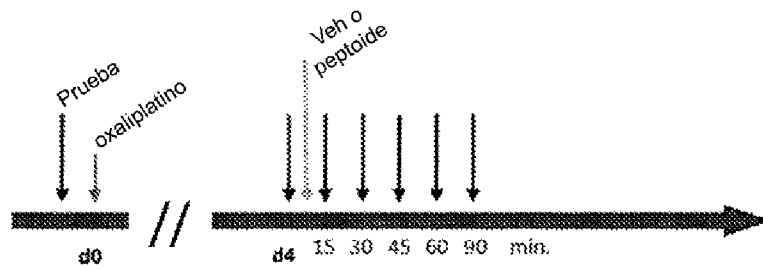
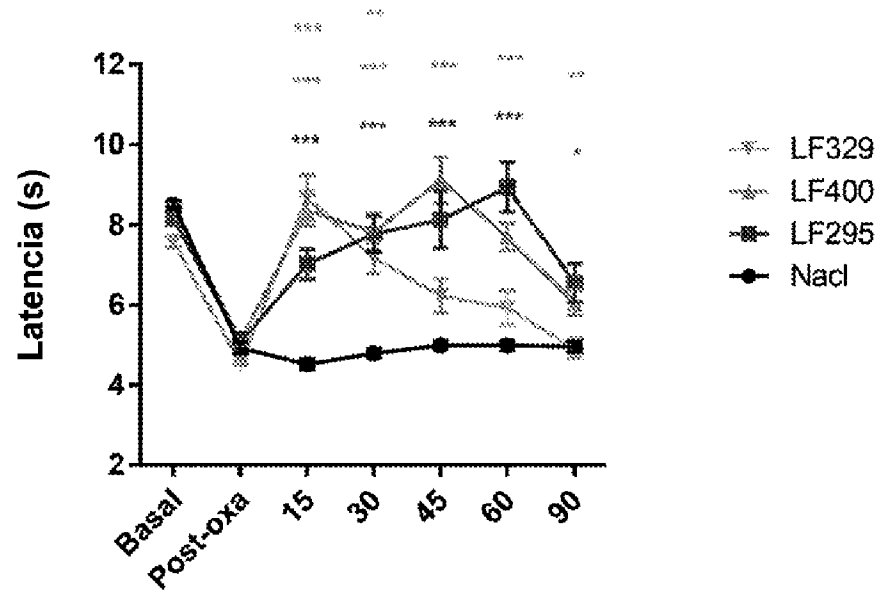


Figura 16

A



B



C

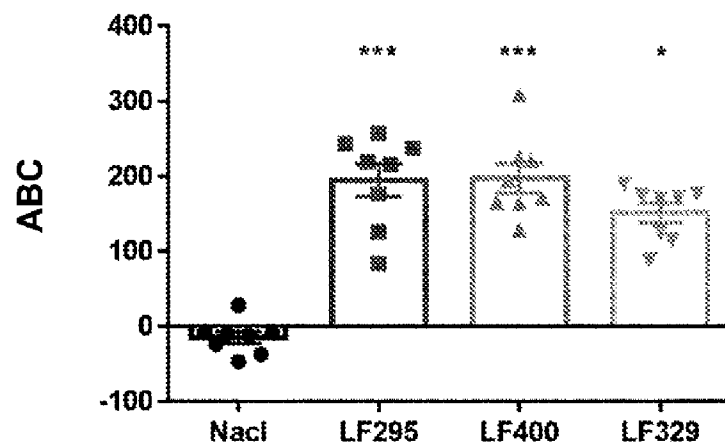
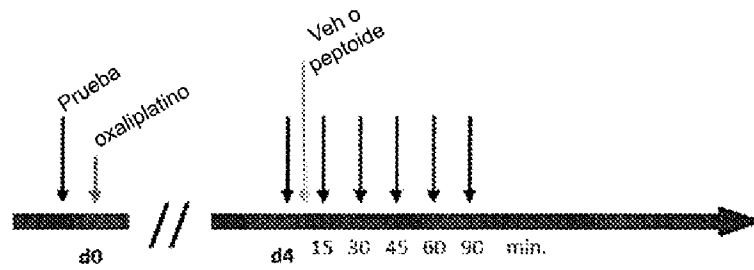
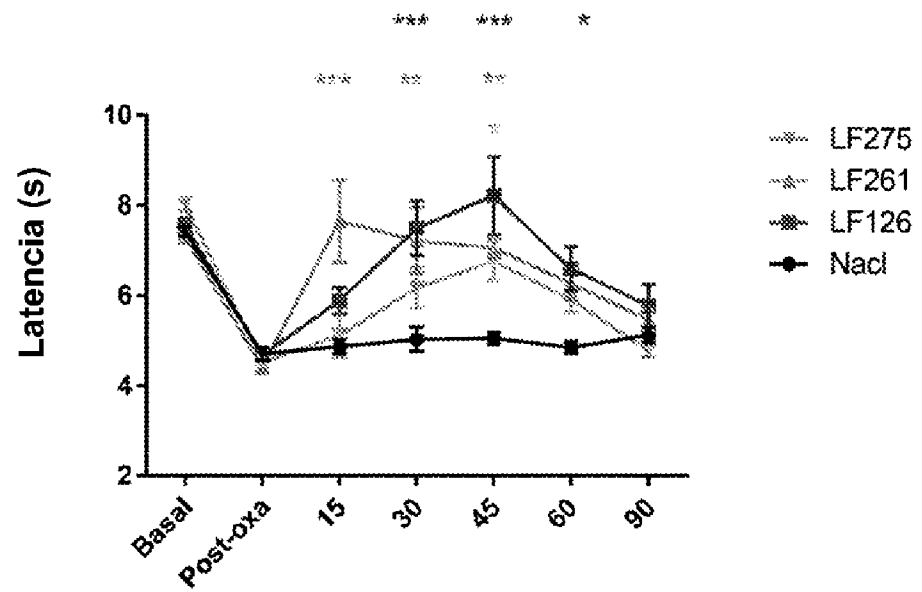


Figura 17

A



B



C

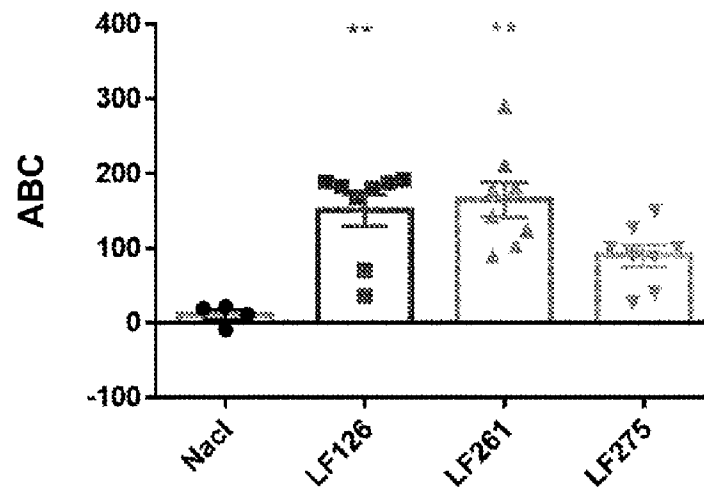
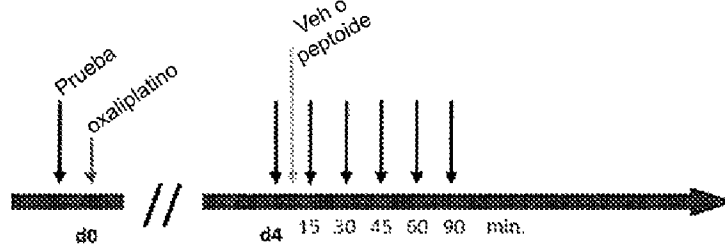
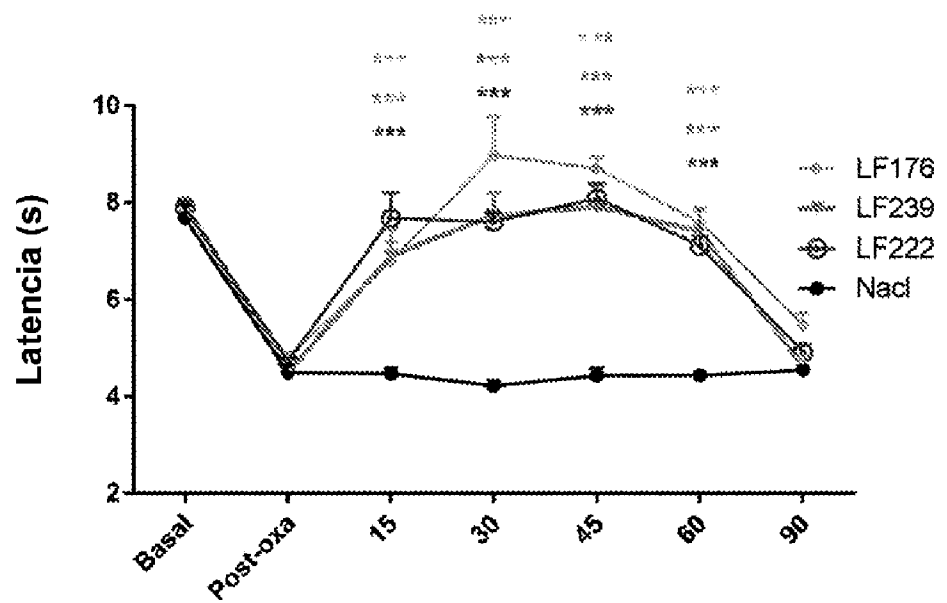


Figura 18

A



B



C

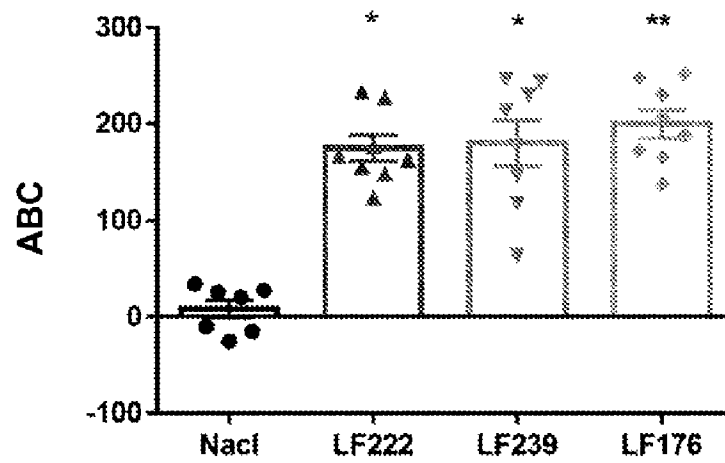
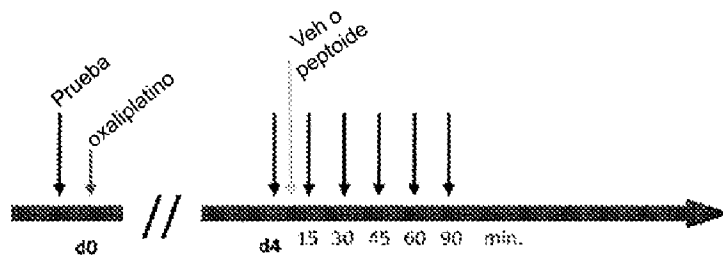
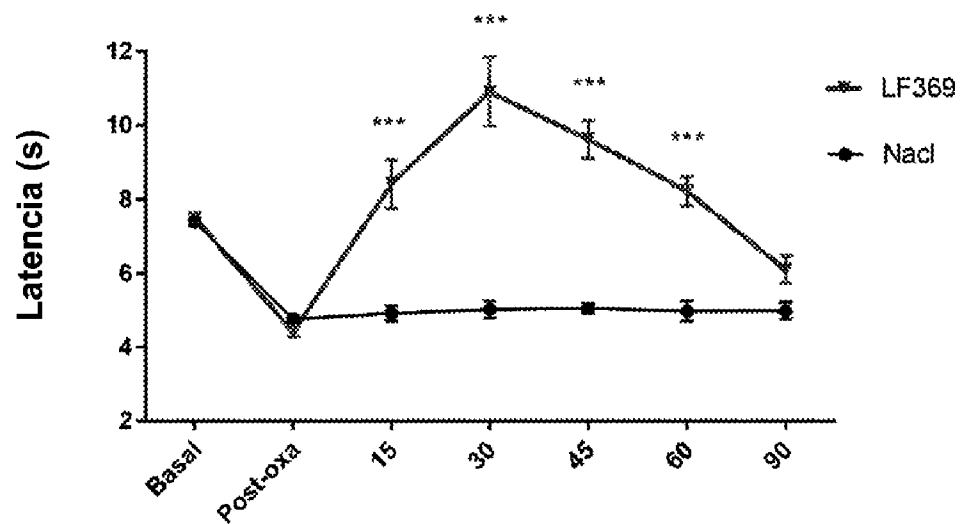


Figura 19

A



B



C

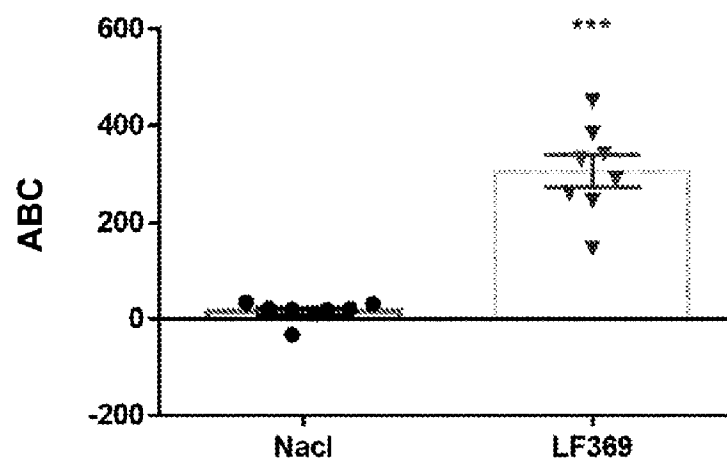


Figura 20