

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 754**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2020** **PCT/EP2020/077642**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2021** **WO21064165**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2020** **E 20780745 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024** **EP 4041748**

54 Título: **Compuestos peptídicos para reducir los efectos secundarios de agonistas del receptor CB₁**

30 Prioridad:

03.10.2019 EP 19382856

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

30.10.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE BARCELONA (20.0%)

Centre de Patentes de la UB,

Baldiri Reixac 4 - Torre D

08028 Barcelona, ES;

UNIVERSITAT POMPEU FABRA (20.0%);

UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA

(20.0%);

INSTITUTO DE MEDICINA MOLECULAR JOÃO

LOBO ANTUNES (20.0%) y

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

DE LISBOA (20.0%)

72 Inventor/es:

CASADÓ BURILLO, VICENT;

MORENO GUILLÉN, ESTEFANIA;

MALDONADO LÓPEZ, RAFAEL;

ANDREU MARTÍNEZ, DAVID;

GALLO, MARÍA;

PARDO CARRASCO, LEONARDO;

CASTANHO, MIGUEL;

NEVES, VERA y

CAVACO, MARCO

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 984 754 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

Compuestos peptídicos para reducir los efectos secundarios de agonistas del receptor CB₁

5 La presente invención se refiere al campo del tratamiento farmacológico con agonistas del receptor CB₁.

Antecedentes técnicos

10 Casi uno de cada cinco europeos padece dolor crónico, lo que afecta su vida laboral, social y familiar y representa casi 500 millones de días laborales perdidos cada año, lo que le cuesta a la economía europea al menos 34 mil millones de euros. Se espera que el mercado de analgésicos aumente hasta los 100 mil millones de euros en 2019, lo que pone de manifiesto la necesidad de fármacos novedosos y complementarios que puedan aliviar eficazmente el dolor en pacientes crónicos evitando efectos secundarios indeseables.

15 La activación de los receptores cannabinoides CB₁ (CB₁R) por agonistas o agonistas parciales del receptor CB₁ tales como Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), el principal componente psicoactivo de *Cannabis sativa*, produce respuestas farmacológicas de gran interés para fines terapéuticos, incluye el tratamiento y/o la prevención del dolor tal como el dolor asociado con migrañas graves, artrosis, endometriosis, artritis reumatoide, fibromialgia, dolor de espalda, dolor de rodilla, dolor neuropático de origen periférico o central, tratamiento orexígeno, como antiemético durante la quimioterapia en el tratamiento del cáncer, para el tratamiento del glaucoma, en el tratamiento de la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple y en el tratamiento de trastornos del movimiento incluyendo entre otros discinesias, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson (véanse Kandasamy R *et al.*, Eur J Pharmacol. 5 de enero de 2018; 818:271-277; Baron EP *et al.*, Headache Pain. 24 de mayo de 2018;19(1):37; Russo EB *et al.*, Cannabis Cannabinoid Res. 1 de julio de 2016;1(1):154-165; Miller S *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 3 de diciembre de 2018;59(15):5904-5911; Escudero-Lara A, *et al.*, IASP (International Association for the Study of Pain) 7th World Congress on Pain. Boston, EE. UU. 12-16 de septiembre de 2018, Abstract ID: 471100; La Porta C *et al.*, Pain. Octubre de 2015;156(10):2001-12; Maldonado R. *et al.*, Pain. Febrero de 2016;157 Supl. 1:S23-32; Engeli S., Handb Exp Pharmacol. 2012;(209):357-81; Al-Ghezi ZZ *et al.* Front Immunol. 21 de agosto de 2019;10:1921; Allen D *et al.*, Clin J Oncol Nurs. 1 de febrero de 2019;23(1):23-26; Buhmann C *et al.*, J Neural Transm (Viena). Julio de 2019;126(7):913-924; Valdeolivas S *et al.*, Int J Mol Sci. 23 de marzo de 2017;18(4); Donovan KA *et al.*, J Adolesc Young Adult Oncol. 22 de agosto de 2019. [Publicación electrónica avance de la edición impresa]).

35 Sin embargo, esta activación de CB₁R se asocia a una variedad de efectos negativos tales como deterioro de la memoria y otras respuestas psicoactivas tales como alteraciones de ansiedad y trastornos en la interacción social con importantes consecuencias en los consumidores de cannabis que constituyen importantes inconvenientes para el uso de cannabinoides como agentes terapéuticos.

40 Por este motivo, existe un enorme interés médico en aprovechar los efectos beneficiosos del THC y otros agonistas del receptor CB₁.

Estudios de comportamiento llevados a cabo en ratones que carecen de receptores 5-HT_{2A} (5-HT_{2A}R) revelaron una notable disociación dependiente de 5-HT_{2A}R en los efectos antinociceptivos beneficiosos del THC y sus propiedades amnésicas perjudiciales. Se ha descrito que los efectos específicos del THC tales como las deficiencias de memoria, alteraciones de ansiedad y la interacción social están bajo el control del 5-HT_{2A}R, pero no sus efectos agudos hipolocomotores, hipotérmicos, ansiógenos y antinociceptivos (Viñals X. *et al.*, PLoS Biol. 9 de julio de 2015; 13 (7): e1002194).

50 Se ha demostrado que CB₁R y 5-HT_{2A}R forman heterómeros que se expresan y son funcionalmente activos en regiones cerebrales específicas implicadas en el deterioro de la memoria y que alterar la formación de los heterómeros es una estrategia valiosa que conduce a una anulación selectiva de los deterioros de la memoria y otros efectos secundarios indeseables provocados por la exposición a agonistas de CB₁R tales como THC (Viñals X. *et al.*, PLoS Biol. 9 de julio de 2015; 13 (7): e1002194).

55 También se ha divulgado que péptidos sintéticos con la secuencia de hélices transmembrana 5 y 6 del receptor CB₁, fusionados con un péptido de penetración celular, pueden alterar la heteromerización del receptor con 5-HT_{2A}R *in vivo*, véase: JOAQUÍN BOTTA ET AL., JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 294, n.º 45, 29 de agosto de 2019.

60 Los inventores han descubierto ahora nuevos péptidos sintéticos que no sólo son capaces de alterar los heterómeros formados por el receptor cannabinoide CB₁R y el receptor de serotonina 5HT_{2A}R de forma más eficaz que los péptidos conocidos anteriormente, sino que también tienen una mayor estabilidad hidrolítica y pueden penetrar eficazmente la barrera hematoencefálica.

Compendio de la invención

65 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a la provisión de compuestos de fórmula (I)

AA¹-AA²-D-Ile-D-Tyr-AA³-D-Tyr-D-Ala-D-Tyr-D-Val-D-Ala-Gly-D-Ile-D-Leu-D-Lys-D-Arg-D-Trp-NH₂ (I)

5 AA¹ representa un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-triptófano (D-Trp), D-1-naftilalanina (D-1-Nal) y D-2-naftilalanina (D-2-Nal);

AA² representa un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-leucina (D-Leu), D-norleucina (D-Nle) y D-fenilalanina (D-Phe); y

10 AA³ representa un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-metionina (D-Met), D-tirosina (D-Tyr) y D-norleucina (D-Nle).

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15 En una realización particular, AA¹ representa D-triptófano (D-Trp).

En una realización particular, AA² representa D-leucina (D-Leu).

20 En una realización particular, AA³ representa D-tirosina (D-Tyr).

En una realización particular, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

D-Trp-D-Leu-D-Ile-D-Tyr-D-Met-D-Tyr-D-Ala-D-Tyr-D-Val-D-Ala-Gly-D-Ile-D-Leu-D-Lys-D-Arg-D-Trp-NH₂

25 y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas o veterinarias que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de compuestos de fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y excipientes farmacéuticamente aceptables. Farmacia, en el contexto de la presente invención, se refiere tanto a medicina humana como a medicina veterinaria.

30 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en combinación con un agonista del receptor CB₁ para su uso como un medicamento.

35 En una realización particular, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos en combinación con un agonista del receptor CB₁ para su uso en el tratamiento o la prevención en un animal, incluyendo un ser humano, de una enfermedad susceptible de mejora por agonismo del receptor CB₁.

40 En una realización particular, la enfermedad susceptible de mejora por agonismo del receptor CB₁ se selecciona del grupo que consiste en dolor asociado con migrañas graves, artrosis, endometriosis, artritis reumatoide, fibromialgia, dolor de espalda, dolor de rodilla, dolor neuropático de origen periférico o central, tratamiento orexígeno, como antiemético durante la quimioterapia, para el tratamiento del glaucoma, en el tratamiento de la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple y en el tratamiento de trastornos del movimiento incluyendo entre otros discinesias y enfermedad de Parkinson.

45 En una realización particular, el tratamiento y/o la prevención puede reducir el deterioro de la memoria y/o alteraciones de ansiedad provocadas por el agonista del receptor CB₁.

50 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en la reducción de los efectos secundarios de los agonistas del receptor CB₁, tales como deterioro de la memoria y otras respuestas psicoactivas tales como alteraciones de ansiedad, y trastornos en la interacción social, en un paciente tratado con un agonista del receptor CB₁. Se considera que un paciente es un mamífero, en particular un ser humano afectado por una enfermedad susceptible de mejorar mediante la administración de un agonista del receptor CB₁, en particular dolor, dolor asociado con migrañas graves, artrosis, endometriosis, artritis reumatoide, fibromialgia, dolor de espalda, dolor de rodilla, dolor neuropático de origen periférico o central, tratamiento orexígeno, como antiemético durante la quimioterapia, para el tratamiento del glaucoma, en el tratamiento de la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple y en el tratamiento de trastornos del movimiento incluyendo entre otros discinesias y enfermedad de Parkinson.

60 En una realización particular de los aspectos tercer y cuarto de la presente invención, el agonista del receptor CB₁ o bien es un agonista completo o bien un agonista parcial.

65 En una realización más particular de los aspectos tercero y cuarto de la presente invención, el agonista del receptor CB₁ se selecciona del grupo que consiste en endocannabinoides producidos por el cuerpo de los mamíferos tales como 2-araquidonoilglicerol (2-AG), éter glicerílico de 2-araquidonilo (2-AGE, éter noladín), anandamida (N-

araquidonoiletanolamina o AEA), N-araquidonoil-dopamina, palmitoiletanolamida (PEA); cannabinoides vegetales tales como 11-hidroxi- Δ^8 -tetrahidrocannabinol, 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol, cannabinol, Δ^8 -tetrahidrocannabinol, Δ^9 -tetrahidrocannabinol (dronabinol, THC o Δ^9 -THC) y cannabinoides sintéticos tales como AM-2201 (1-(5-fluoropentil)-3-(1-naftoil)indol), AM-678 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA), CP 55.940 ([(-)-cis-3-[2-hidroxi-4-(1,1-dimetilheptil)fenil]-trans-4-(3-hidroxipropil)-ciclohexanol]), HU-210, JWH-018 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), JWH-073, linoleil-etanolamida, levonantradol (CP 50.556-1), nabilona, nabiximoles y WIN 55.212-2, en particular el cannabinoide de origen vegetal THC.

Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse mediante un método que comprende las etapas de:

- a) Proporcionar los aminoácidos (D-Ala, D-Arg, Gly, D-Ile, D-Leu, D-Lys, D-Met, D-1-Nal, D-2-Nal, D-Nle, D-Phe, D-Trp, D-Tyr, D-Val) que forman parte del péptido,
- b) Proteger los aminoácidos D-Lys y D-Trp con Boc,
- c) Proteger el aminoácido D-Arg con 2,2,4,6,7 pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo,
- d) Proteger el aminoácido D-Thr con t-butilo,
- e) Ensamblar los aminoácidos y los aminoácidos protegidos en una resina de Fmoc-Rink-amida efectuando los acoplamientos con un exceso de Fmoc-aminoácido en presencia de un exceso de hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y un exceso de DIEA con DMF como disolvente
- f) Escindir los grupos laterales protegidos del péptido y el péptido de la resina preferiblemente con el uso de $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/3,6\text{-dioxo-1,8-octaneditioil (DODT)/triisopropilsilano}$.

Tal como se usa en el presente documento, "un compuesto de fórmula (I) en combinación con un agonista del receptor CB_1 " se refiere o bien a una combinación fija del compuesto de fórmula (I) y el agonista del receptor CB_1 en una forma posológica unitaria, o un kit de partes que comprende una primera composición que comprende el compuesto de fórmula (I) y una segunda composición que comprende el agonista del receptor CB_1 para la administración combinada, en donde el compuesto de fórmula (I) y el agonista del receptor CB_1 pueden administrarse independientemente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo que permitan especialmente la reducción del efecto adverso de los agonistas del receptor CB_1 , o cualquier combinación de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agonista del receptor CB_1 " se refiere a un compuesto capaz de activar el receptor cannabinoide CB_1 que incluye ligandos, endocannabinoides producidos por el cuerpo de los mamíferos tales como 2-araquidonoilglicerol (2-AG), éter glicerílico de 2-araquidonilo (2-AGE, éter noladín), anandamida (N-araquidonoiletanolamina o AEA), N-araquidonoil-dopamina, palmitoiletanolamida (PEA); cannabinoides vegetales tales como 11-hidroxi- Δ^8 -tetrahidrocannabinol, 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol, cannabinol, Δ^8 -tetrahidrocannabinol, Δ^9 -tetrahidrocannabinol (dronabinol, THC o Δ^9 -THC) y cannabinoides sintéticos tales como AM-2201 (1-(5-fluoropentil)-3-(1-naftoil)indol), AM-678 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA), CP 55.940 ([(-)-cis-3-[2-hidroxi-4-(1,1-dimetilheptil)fenil]-trans-4-(3-hidroxipropil)-ciclohexanol]), HU-210, JWH-018 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), JWH-073, linoleil-etanolamida, levonantradol (CP 50.556-1), nabilona, nabiximoles y WIN 55.212-2.

En una realización preferida, el agonista del receptor cannabinoide CB_1 es Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas posológicas que, dentro del alcance del juicio médico razonable, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin toxicidad significativa, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional con una razón beneficio/riesgo razonable. Cada soporte, excipiente, etc., también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la composición farmacéutica. También debe ser adecuado para su uso en contacto con el tejido o el órgano de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones proporcionales con una razón beneficio/riesgo razonable. Pueden encontrarse soportes, excipientes, etc. adecuados en textos farmacéuticos convencionales e incluyen, a modo de ejemplo, conservantes, aglutinantes, humectantes, emolientes y antioxidantes.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" designa cualquier sal que, tras su administración al paciente, puede proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto como se describe en el presente documento. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos proporcionados en el presente documento se sintetizan a partir del compuesto parental, que contiene una fracción básica o ácida, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, 2-propanol o acetonitrilo. Los ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen sales de adición de ácidos minerales tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y *p*-toluenosulfonato. Los

ejemplos de sales de adición de álcali incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y amonio, y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, *N,N*-dialquiletanolamina, trietanolamina y sales de aminoácidos básicos.

- 5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra “comprender” y variaciones de la palabra no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra “comprender” abarca el caso de “que consiste en”.

Síntesis de péptidos

- 10 La síntesis de péptidos según la presente invención, así como de los péptidos de los ejemplos de referencia, puede llevarse a cabo mediante métodos de síntesis convencionales para péptidos.

- 15 El procedimiento descrito en los siguientes párrafos se ha usado realmente para la preparación de los péptidos descritos en los ejemplos y puede usarse para preparar cualquier péptido según la invención.

- Se ensamblaron los péptidos en 50 μ mol (0,106 g; 0,47 mmol/g) de resina Fmoc-Rink-amida ChemMatrix en un instrumento Prelude (Protein Technologies, Tucson, AZ) ejecutando protocolos de síntesis de Fmoc optimizados. Las protecciones de la cadena lateral fueron Boc (usado para proteger D-Lys, Trp y D-Trp), 2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofuran-5-sulfonilo (usado para proteger D-Arg) y t-butilo (usado para proteger Glu, Ser, Thr, Tyr y D-Tyr). Los acoplamientos dobles se realizaron sistemáticamente con un exceso de 5 veces de Fmoc-aminoácido en presencia de hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU, exceso de 5 veces) y DIEA (exceso de 10 veces) con DMF como disolvente durante 5 + 5 min.

- 25 Los cócteles de desprotección y escisión fueron $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/3,6\text{-dioxo-1,8-octaneditiol (DODT)}/\text{triisopropilsilano}$ (94:2,5:2,5:1 v/v, 90 min). El producto de síntesis se aisló por precipitación con éter dietílico enfriado, se centrifugó durante 3 x 10 min a 4 °C, se recogió en H_2O y se liofilizó.

Análisis y purificación de péptidos

- 30 Se ha usado el siguiente protocolo para purificar y analizar los péptidos descritos en la presente solicitud.

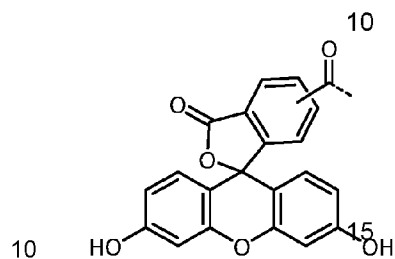
- Los péptidos en bruto liofilizados se reconstituyeron de forma directa (H_2O , acidificada con HOAc). Los péptidos en bruto se analizaron mediante HPLC en columnas Luna C18 (4,6 x 50 mm, 3 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) en un sistema LC-20AD (Shimadzu, Kioto, Japón). La elución se realizó con gradientes lineales de disolvente B (TFA al 0,036 % v/v en CH_3CN) en A (TFA al 0,045 % v/v en H_2O) durante 15 minutos. Los péptidos se purificaron mediante HPLC preparativa en una columna Luna C18 (10 x 250 mm, 10 μ m, Phenomenex) en un instrumento LC-8A de Shimadzu usando gradientes lineales de disolvente B (TFA al 0,1 % v/v en CH_3CN) en A (TFA al 0,1 % v/v en H_2O) durante 30 min, a una velocidad de flujo de 7 ml/min con detección UV a 220 nm. Las fracciones de pureza satisfactoria (>95 %) mediante HPLC analítica se agruparon, liofilizaron y volvieron a analizar para determinar su identidad mediante HPLC-MS en C18 (columna de 4,6 x 150 mm, 3,5 μ m, Phenomenex) en un instrumento de LC-MS 2010EV de Shimadzu, eluyendo con gradientes lineales de disolvente B (HCOOH al 0,08 % v/v en CH_3CN) en A (TFA al 0,1 % v/v en H_2O) durante 15 min a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

- 45 Abreviaturas:

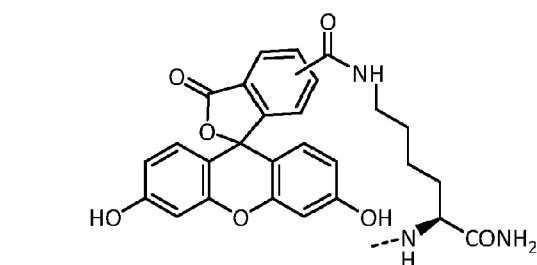
A lo largo de la presente solicitud se han usado las siguientes abreviaturas:

- Ala: L-alanina
 50 D-Ala: D-alanina
 D-Arg: D-arginina
 Glu: ácido L-glutámico
 Gly: glicina
 Ile: L-isoleucina
 55 D-Ile: D-isoleucina
 Leu: L-leucina
 D-Leu: D-leucina
 D-Lys: D-lisina
 Met: L-metionina
 60 D-Met: D-metionina
 D-1-Nal: 1-naftilalanina (ácido (2R)-2-amino-3-naftalen-1-ilpropanoico)
 D-2-Nal: 2-naftilalanina (ácido (2R)-2-amino-3-naftalen-2-ilpropanoico)
 D-Nle: D-norleucina
 Phe: L-fenilalanina
 65 D-Phe: D-fenilalanina
 Ser: L-serina

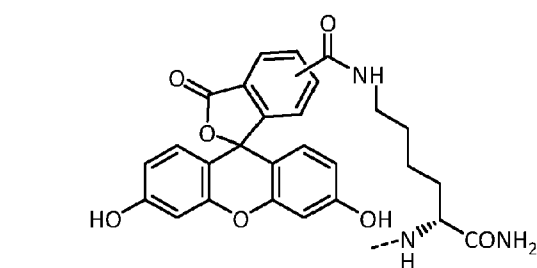
Thr: L-treonina
 Trp: L-triptófano
 D-Trp: D-triptófano
 Tyr: L-tirosina
 D-Tyr: D-tirosina
 Val: L-valina
 D-Val: D-valina
 CF: Un resto de 5(6)-carboxifluoresceína de fórmula:



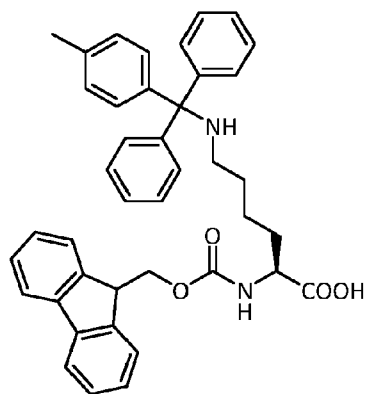
-Lys(CF)-NH₂: Un resto de fórmula:



-D-Lys(CF)-NH₂: Un resto de fórmula:



20 Fmoc-Lys(Mtt)-OH



Ejemplos

25 Ejemplo de referencia 1:
 Se preparó un péptido de fórmula Glu-Thr-Tyr-Leu-Met-Phe-Trp-Ile-Gly-Val-Thr-Ser-Val-Leu-Leu-Leu-Phe-Ile-Val-

Tyr-Ala-Tyr-Met-Tyr-Ile-Leu-Trp-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-NH₂ (SEQ ID NO 1-NH₂) usando el método sintético general explicado anteriormente.

Este péptido corresponde a la región transmembrana 5 del receptor cannabinoide 1 (TM5) acoplada a la secuencia del péptido de penetración celular Tat (Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg) (SEQ ID NO 2).

HPLC: t_R 8,10 min (gradiente lineal del 40-90 % de B en A a lo largo de 15 min). ESI-MS; m/z 1576,45 [M+3H]⁺3, 1182,65 [M+4H]⁺4, 946,30 [M+5H]⁺5, 788,70 [M+6H]⁺6, 676,20 [M+7H]⁺7, 591,75 [M+8H]⁺8 (MW calculado: 4727,76).

Ejemplo de referencia 2:

Se preparó un péptido de fórmula Val-Tyr-Ala-Tyr-Met-Tyr-Ile-Leu-Trp-D-Ala-Gly-D-Ile-D-Leu-D-Lys-D-Arg-D-Trp-NH₂ usando el mismo método de síntesis explicado anteriormente.

Este péptido se deriva de la subsecuencia de aminoácidos 19 a 27 de TM5 acoplada a la secuencia del péptido de penetración celular D-Ala-Gly-D-Ile-D-Leu-D-Lys-D-Arg-D-Trp-NH₂.

HPLC: t_R 5,24 min (gradiente lineal del 30-60 % de B en A a lo largo de 15 min). ESI-MS; m/z: 1023,60 [M+2H]⁺2, 682,75 [M+3H]⁺3, 511,20 [M+4H]⁺4, 411,90 [M+5H]⁺5, 340,90 [M+6H]⁺6, 292,00 [M+7H]⁺7 (MW calculado: 2045,52).

Ejemplo de referencia 3:

Un péptido de fórmula D-Trp-D-Leu-D-Ile-D-Tyr-D-Met-D-Ala-Gly-D-Ile-D-Leu-D-Lys-D-Arg-D-Trp-NH₂ se preparó usando el mismo método de síntesis explicado anteriormente.

Este péptido se deriva de la versión retro-enantiomérica de la subsecuencia de aminoácidos 23 a 27 de TM5 (D-Trp-D-Leu-D-Ile-D-Tyr-D-Met) acoplada a la secuencia del péptido de penetración celular D-Ala-Gly-D-Ile-D-Leu-D-Lys-D-Arg-D-Trp-NH₂. Por versión retro-enantiomérica de una secuencia peptídica se entiende una nueva secuencia peptídica en la que todos los aminoácidos se reemplazan por sus D-enantiómeros y en la que se invierte el orden de los aminoácidos en la secuencia.

HPLC: t_R 6,33 min (gradiente lineal del 20-60 % de B en A a lo largo de 15 min). ESI-MS; m/z: 1549,70 [M+1H]⁺1, 775,45 [M+2H]⁺2, 517,35 [M+3H]⁺3, 389,95 [M+4H]⁺4 (MW calculado: 1548,96).

Ejemplo 1:

Un péptido de fórmula D-Trp-D-Leu-D-Ile-D-Tyr-D-Met-D-Tyr-D-Ala-D-Tyr-D-Val-D-Ala-Gly-D-Ile-D-Leu-D-Lys-D-Arg-D-Trp-NH₂ se preparó usando el mismo método de síntesis explicado anteriormente.

Este péptido se deriva de la versión retro-enantiomérica de la subsecuencia de aminoácidos 19 a 27 de TM5 (D-Trp-D-Leu-D-Ile-D-Tyr-D-Met-D-Tyr-D-Ala-D-Tyr-D-Val) acoplada a la secuencia del péptido de penetración celular D-Ala-Gly-D-Ile-D-Leu-D-Lys-D-Arg-D-Trp-NH₂. Por versión retro-enantiomérica de una secuencia peptídica se entiende una nueva secuencia peptídica en la que todos los aminoácidos se reemplazan por sus D-enantiómeros y en la que se invierte el orden de los aminoácidos en la secuencia.

HPLC: t_R 7,10 min (gradiente lineal del 30-60 % de B en A a lo largo de 15 min). ESI-MS; m/z: 1023,90 [M+2H]⁺2, 682,70 [M+3H]⁺3, 512,85 [M+4H]⁺4, 409,90 [M+5H]⁺5, 340,95 [M+6H]⁺6, 293,00 [M+7H]⁺7 (MW calculado: 2045,52).

Ejemplo 2:

El péptido de ejemplo 1 se marcó uniendo un resto -Lys(CF)-NH₂ en su extremo carboxilo.

El marcaje (incorporación de 5(6)-carboxifluoresceína) al extremo carboxilo terminal del péptido se llevó a cabo añadiendo una lisina marcada adicional a la secuencia peptídica. Para ello se utilizó Fmoc-Lys(Mtt)-OH.

En dicho compuesto, la cadena lateral de la lisina está protegida con un grupo protector metiltritilo (Mtt), que puede desprotegerse selectivamente en resina en presencia de TFA al 1 % (en estas condiciones, todos los demás grupos protectores de la cadena lateral son estables).

Después de condensar dicho compuesto con el aminoácido carboxilo terminal del péptido que va a marcarse, se retira el metiltritilo y se hace reaccionar el grupo ε-NH₂ de la cadena lateral de lisina "extra" con el grupo -COOH de 5(6)-carboxifluoresceína para obtener el péptido marcado. Por último, se amida el grupo carboxilo terminal.

Este péptido ligeramente modificado se ha usado para evaluar la translocación en la BHE *in vitro* y la internalización del péptido.

Métodos de prueba

A. Digestión con tripsina

- 5 Se ha sometido a prueba la estabilidad de los péptidos frente a la acción de la tripsina mediante el método descrito a continuación.

10 Se preparó una disolución de tripsina de 1000 µg/1000 µl (Thermo Fisher Scientific) suspendiendo la enzima liofilizada en tampón bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8,2. Se incubó el péptido disuelto en el mismo tampón (1 µg/µl) con tripsina (razón de péptido:tripsina = 100:1) durante 24 h a 37 °C. Se recogieron muestras en diversos puntos de tiempo y se detuvo la digestión mediante la adición del 20 % (v/v) de ácido fórmico al 0,5 % en H₂O. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que se analizaron mediante HPLC-MS de fase inversa. Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos se ajustaron con GraphPad Prism.

15 B. Cultivo de células bEnd.3

Se cultivaron células de endotelioma cerebral bEnd.3 (ATCC® CRL-2299TM) como una monocapa en botellas T de 75cm² en DMEM complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y disolución de antibióticos de penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco™, EE. UU.). Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada del 95 % de aire y el 5 % de CO₂ a 37 °C (MCO-18AIC (UV), Sanyo, Japón), y el medio se cambió cada dos días. Cuando las células fueron confluentes, se recogieron de las botellas T de cultivo celular con tripsina-EDTA (Gibco™, EE. UU.) y se usaron en diferentes ensayos (proliferación celular, translocación en la BHE *in vitro* y complementación de fluorescencia bimolecular *in vitro*).

25 C. Ensayo de viabilidad celular

La citotoxicidad *in vitro* del compuesto que va a evaluarse se estudia usando la misma línea celular del modelo de BHE *in vitro*, concretamente las células bEnd.3, para evaluar la posible toxicidad. La línea celular bEnd.3 se expuso a concentraciones crecientes del compuesto durante 24 h.

30 La citotoxicidad de los péptidos hacia las células bEnd.3 se ha sometido a prueba mediante el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Blue®, según las instrucciones del fabricante que se describen a continuación.

El ensayo se basa en la capacidad de las células viables para reducir la resazurina a resorufina, un metabolito muy fluorescente. Las células no viables no pueden generar resorufina. Por tanto, usando este enfoque es posible distinguir entre células metabólicas y no metabólicas e indirectamente determinar la citotoxicidad de diferentes compuestos. Se sembraron células bEnd.3 en una placa de 96 pocillos (Corning, EE. UU.) a 10.000 células/100 µl/pocillo y se incubaron durante 24 h. Después de la retirada del medio, se añadieron a los pocillos 100 µl de los péptidos diluidos previamente (intervalo entre 0,01 y 50 µM) en medio DMEM. Después de 24 h de incubación, se añadieron 20 µl de reactivo CellTiter-Blue® a cada pocillo y se incubaron durante 3 h en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % a 37 °C. La intensidad de fluorescencia se midió con una λ_{exc} = 560 nm y una λ_{em} = 590 nm usando un lector de placas Infinite F200 de TECAN. Se usaron medio y medio que contenía Triton X-100 al 1 % como controles positivos (viabilidad celular del 100 %) y controles negativos (viabilidad celular del 0 %), respectivamente. La viabilidad celular (%) se determinó usando la siguiente ecuación:

$$45 \quad \text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{F_P - F_{NC}}{F_{PC} - F_{NC}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

donde F_P es la intensidad de fluorescencia de las células tratadas con péptido, F_{NC} es la intensidad de fluorescencia para los controles negativos, y F_{PC} es la intensidad de fluorescencia para los controles positivos.

50 Los experimentos se realizaron en días diferentes usando cultivos celulares cultivados de manera independiente.

D. Ensayo de translocación de BHE *in vitro*

55 Se dejó que las células bEnd.3 crecieran hasta la confluencia en una botella T de cultivo. Las células se recogieron cuidadosamente con tripsina-EDTA (Gibco™, EE. UU.) y se sembraron a razón de 5.000 células/pocillo en insertos de cultivo de tejido recubiertos con fibronectina al 1 % (membrana de poliéster (PET) transparente con poros de 1,0 µm) para placas de 24 pocillos (BD Falcon, EE. UU.). A lo largo de 10 días, el medio se cambió cada dos días. Después de 10 días, las células se lavaron dos veces con PBS 1x y una vez con medio DMEM sin rojo fenol (Gibco/Thermo Fisher, EE. UU.). Entonces se añadieron los péptidos diluidos en DMEM sin rojo fenol hasta una concentración final de 1 µM al lado apical del modelo de BHE *in vitro*. Los experimentos se realizaron en días diferentes usando cultivos celulares cultivados de manera independiente.

La translocación de péptidos marcados con 5(6)-carboxifluoresceína se determina mediante la emisión de

fluorescencia.

El modelo de BHE *in vitro* consiste en un sistema Transwell con un inserto en el que se cultivan células bEnd.3 separando dos cámaras (véase la figura 1). El inserto, o lado apical, corresponde al lado sanguíneo de la barrera hematoencefálica, mientras que el lado basolateral (cámara inferior) corresponde al lado cerebral de la barrera.

Para estudiar las capacidades de translocación de un péptido, se añadió 1 µM del péptido marcado con 5(6)-carboxifluoresceína que va a evaluarse al lado apical del modelo de BHE *in vitro* descrito anteriormente. El volumen del lado apical y el volumen basolateral se recogieron después de 24 h de incubación y la fluorescencia en esas muestras se midió por separado en un lector de placas. El porcentaje internalizado se obtuvo como la diferencia entre la fluorescencia total y la suma de la fluorescencia de los lados apical y basolateral.

Después de 24 h de incubación, se recogen y se analizan muestras de los lados apical y basolateral. La fluorescencia se midió usando el lector de placas Infinite F200 de TECAN. El porcentaje (%) de translocación se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Translocación (\%)} = \left(\frac{F_i - F_{\text{células}}}{F_{\text{péptido}}} \times 1,25 \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

F_i es la intensidad de fluorescencia recuperada, $F_{\text{células}}$ es la intensidad de fluorescencia recuperada de células sin incubación de péptidos, y $F_{\text{péptido}}$ es la intensidad de fluorescencia del péptido total añadido inicialmente al lado apical del sistema Transwell.

La integridad de la barrera endotelial se evalúa a través de la permeabilidad de dextrano marcado con fluorescencia (FD) con un peso molecular de 4 kDa (FD4). La depuración de la sonda fluorescente del lado apical en presencia o ausencia del péptido marcado proporciona información sobre la integridad de la BHE.

E. Determinación *in vitro* de la capacidad para alterar heterómeros de CB₁R y 5-HT_{2A}R mediante complementación de fluorescencia bimolecular

Se usó el método descrito en "Viñals* X, Moreno* E, Lanfumey L, Cordoní A, Pastor A, de La Torre R, Gasperini P, Navarro G, Howell LA, Pardo L, Lluís C, Canela EI, McCormick* PJ, Maldonado* R, Robledo* P. Cognitive Impairment Induced by Delta9-tetrahydrocannabinol Occurs through Heteromers between Cannabinoid CB1 and Serotonin 5-HT2A Receptors. PLoS Biology, 13(7):e1002194 (2015)" con las ligeras modificaciones del presente documento descritas en el presente documento para determinar la capacidad *in vitro* de los péptidos para alterar los heterómeros CB₁R y 5-HT_{2A}R.

Vectores de expresión

Para obtener las proteínas semitruncadas YFP-Venus fusionadas a los receptores de interés (5-HT_{2A}R-cYFP, CB₁R-nYFP), se subclonó 5-HT_{2A}R para que estuviera en el mismo marco de lectura que los sitios de restricción de pcDNA3.1-cVenus, que contenía las secuencias que codifican los residuos de aminoácidos 156-238 de la proteína YFP-Venus. Además, CB₁R se subclonó para estar en el mismo marco de lectura que los sitios de restricción de pcDNA3.1-nVenus, que contenía las secuencias que codifican los residuos de aminoácidos 1-155 de la proteína YFP-Venus.

Se sometió a prueba la expresión de las construcciones mediante microscopía confocal y la funcionalidad de la proteína de fusión con el receptor mediante fosforilación de ERK1/2.

Cultivo celular y transfección transitoria

Se cultivaron células de riñón embrionario humano (HEK-293T) obtenidas de la ATCC en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 100 µg/ml, penicilina/estreptomicina 100 U/ml, disolución de aminoácidos no esenciales en MEM (1/100) y suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 5 % (v/v) (todos los complementos eran de Invitrogen, Paisley, Escocia, Reino Unido). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

Ensayos de complementación de fluorescencia

Se transfectaron transitoriamente células que crecían en placas de 6 pocillos con el ADNc que codifica CB₁R fusionado al fragmento N-terminal de YFP-Venus (n-YFP) y 5-HT_{2A}R fusionado al fragmento C-terminal de YFP-Venus (c-YFP) mediante el método de PEI (polietilenimina, Sigma). Las células se incubaron durante 4 h con el ADNc correspondiente junto con PEI y NaCl 150 mM en un medio sin suero. Después de 4 h, el medio se cambió a un medio de cultivo completo nuevo.

Después de 48 h, las células se trataron o no con los péptidos TAT indicados (4 μ M) durante 4 h a 37 °C. Para cuantificar la expresión de YFP-Venus complementada, se lavaron las células dos veces en rápida sucesión en HBSS con glucosa 10 mM, se desprendieron y se resuspendieron en el mismo tampón. Para controlar el número de células, se determinó la concentración de proteína de la muestra usando un kit de ensayo de Bradford (Bio-Rad, Múnich, Alemania) usando diluciones de seroalbúmina bovina como patrones. Se distribuyeron 20 μ g de proteína en microplacas de 96 pocillos (placas negras con fondo transparente, Porvair, King's Lynn, Reino Unido) y se registró la emisión de fluorescencia a 530 nm después de la excitación a 500 nm con un dispositivo Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). La fluorescencia de las proteínas se determinó como la fluorescencia de la muestra menos la fluorescencia de las células no transfectadas (basal). Las células que expresaban 5-HT_{2A}R-cVenus y nVenus o CB₁R-nVenus y cVenus mostraron niveles de fluorescencia similares a los de las células no transfectadas.

Ejemplo 3 (Estabilidad frente a tripsina del compuesto del ejemplo 1)

El análisis por HPLC del compuesto del ejemplo 1, tras la incubación con tripsina proporcionada tal como se describe en el método A anterior, proporcionó los resultados resumidos en la tabla 1

Tabla 1

Compuesto	% a t=0	% a t=24 h
Ejemplo 1	100,00 $\pm$ 2,05	82,96 $\pm$ 4,04

demostrando que el compuesto del ejemplo 1 es muy resistente a la digestión con tripsina, con más del 80 % del péptido de partida sin alterar después de 24 h.

Ejemplo 4 (Citotoxicidad del compuesto del ejemplo 1)

Se ha evaluado la citotoxicidad del compuesto del ejemplo 1 tal como se proporciona según el método B descrito anteriormente y los resultados se resumen en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Concentración (μ M)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	0,049	0,024	0,012
Viabilidad celular (%) Ejemplo 1	75,7	96,6	103,6	96,6	100,0	102,5	98,9	101,7	100,2	95,4	98,7	98,3	98,3

A partir de los resultados anteriores puede observarse que el valor de la CE₅₀ es mayor de 50 μ M. El experimento indica que el compuesto del ejemplo 1 no tiene toxicidad significativa.

Ejemplo 5 (Translocación del compuesto del ejemplo 2)

Se ha evaluado la translocación del compuesto del ejemplo 2 (el péptido marcado con 5(6)-carboxifluoresceína del ejemplo 1) tal como se facilita en el método D descrito anteriormente.

Inicialmente se añadió al lado apical un total de 1 μ M del péptido del ejemplo 2 (el péptido marcado con 5(6)-carboxifluoresceína del ejemplo 1). Después de 24 h de incubación, se cuantificaron las cantidades relativas del péptido en el lado apical, la internalización y el lado basolateral. La cantidad en los lados apical y basolateral se normalizó con respecto a la cantidad total inicial de péptido marcado añadido en la parte superior y se expresó como el porcentaje de la dosis de fluorescencia recuperada. El péptido internalizado es la diferencia entre la cantidad inicial añadida y la del lado apical y basolateral. Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación:

Tabla 3

Compuesto	% de lado apical	% de internalización	% de lado basolateral
Ejemplo 2	36,00	19,98	43,39

Los datos obtenidos demuestran que el péptido del ejemplo 2 (péptido del ejemplo 1 marcado con 5(6)-carboxifluoresceína) pudo translocarse a través de la BHE, con hasta un 43,39 $\pm$ 2,703 % a las 24h con una retención de internalización del 19,98 $\pm$ 7,324 %.

Se evaluó la integridad de la barrera endotelial tal como se describe en el método D. La depuración de la sonda fluorescente (dextrano marcado con fluorescencia (FD) con un peso molecular de 4 kDa (FD4)) del lado apical en presencia o ausencia del péptido marcado fue insignificante, lo que demostró la falta de aberturas en la barrera celular y fuga paracelular.

Ejemplo 6 (Determinación *in vitro* de la capacidad para alterar los heterómeros de CB₁R y 5-HT_{2A}R mediante

complementación de fluorescencia bimolecular)

Se evaluó la capacidad del compuesto del ejemplo 1 para alterar los heterómeros de CB₁R y 5-HT_{2A}R mediante complementación de fluorescencia bimolecular según el método E descrito anteriormente y los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Complementación de fluorescencia bimolecular (unidades de fluorescencia) de compuestos seleccionados (I)

Ej.	Control	Ej. 1	Ej. de ref. 1	Ej. de ref. 2	Ej. de ref. 3
Unidades de fluorescencia	21353	10637	11154	13568	16754
% frente a control	100 %	49,8	52,2	63,5	78,5

Ejemplo 7. Evaluación de la internalización de péptidos mediante microscopía confocal

Se sembraron células bEnd.3, 50.000 células/200 µl, en un µ-portaobjetos de 8 pocillos recubierto con ibiTreat (Ibidi, Alemania) durante 24 h. Entonces se lavaron las células cuidadosamente dos veces con PBS 1x y una vez con medio y se incubaron durante 2 h con péptidos marcados a una concentración final de 10 µM. Después de 2 h, las células se lavaron nuevamente dos veces con PBS 1x y una vez con medio y el núcleo y la membrana se tiñeron con Hoescht 33342 (ThermoFisher, EE. UU.) y CellsMaskTM Deep Red (ThermoFisher, EE. UU.), respectivamente. Se añadieron colorantes de núcleo y membrana a las células a una concentración final de 5 µg/ml y una disolución de trabajo de 0,5X durante 10 min a 37 °C. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS 1x y se tomaron imágenes.

La adquisición se realizó en un microscopio confocal de barrido puntual Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión en aceite alfa Plan-Apochromat × 100 (apertura numérica de 1,46). Se usaron láseres de diodo 405-30 y HeNe633 para excitar Hoesch 33342 (Sigma-Aldrich, España) y CellMaskTM Deep Red tinción de membrana plasmática (ThermoFisher, EE. UU.). Se usó la línea de 488 nm de un láser de argón para excitar el péptido del ejemplo 2 (péptido del ejemplo 1 marcado con 5(6)-carbofluoresceína-Lys). En el modo confocal normal, se grabaron imágenes con zoom de X 0,6 con una resolución de 1024 × 1024. Se usó el software ZEN para la adquisición de imágenes. Se usó el software Fiji para el procesamiento de imágenes. Se adquirieron al menos 12 imágenes en total en tres repeticiones independientes. Para confirmar la internalización del péptido del ejemplo 2 (es decir, el péptido del ejemplo 1 marcado con 5(6)-carbofluoresceína-Lys), se incubaron células bEnd.3 con 10 µM de dicho péptido durante 2 h a 37 °C y se examinaron usando microscopía confocal.

Se observó un patrón punteado de fluorescencia del péptido que indica la presencia del péptido en los compartimentos vesiculares después de la internalización. Esto se muestra en la figura 2.

Ejemplo 8: Determinación *in vivo* del efecto de los péptidos sobre la memoria (prueba de reconocimiento de objetos nuevos)

Se usó el método descrito en "Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A. Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. Nature Neuroscience, 12(9):1152-8 (2009)" con las ligeras modificaciones descritas en el presente documento para evaluar el efecto de los péptidos sobre la memoria. Los resultados se resumen en la tabla 5 a continuación.

El día 1 (habitación), los ratones se habituaron durante 9 minutos al laberinto en V en el que se realizó la tarea. El segundo día (entrenamiento), se volvió a colocar a los ratones en el laberinto en V durante 9 minutos, se presentaron dos objetos idénticos y se registró el tiempo que los ratones dedicaron a explorar cada objeto. Los ratones se colocaron de nuevo en el laberinto 24 h después durante 9 minutos (prueba), uno de los objetos familiares se reemplazó por un objeto nuevo y se computó el tiempo total dedicado a explorar cada uno de los dos objetos (nuevo y familiar). La exploración de objetos se definió como la orientación de la nariz hacia el objeto a menos de 2 cm. Un índice de discriminación se calculó como la diferencia entre el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso o familiar dividido entre el tiempo total de exploración de los dos objetos. Se considera que un índice de discriminación más alto refleja una mayor retención de memoria para el objeto familiar, ya que los ratones normales pasan más tiempo explorando un objeto nuevo que uno familiar.

Se administraron tratamientos con el péptido que iba a someterse a prueba en un vehículo (solución salina más DMSO al 2 %) a una dosis de 20 mg de péptido por kg de peso del ratón o con dicho vehículo solo, por vía intravenosa (i.v.) inmediatamente después del entrenamiento, mientras que se administró vehículo i.p. (5 % v/v de etanol, 5 % v/v de Cremophor-EL y 90 % v/v de solución salina) o 3 mg de THC por kg de ratón disueltos en el vehículo i.p. mediante inyección intraperitoneal (i.p.) 30 min después del péptido.

Tabla 5

	Índice de discriminación	Índice de discriminación
	(media / DE)	% de aumento frente a control

Vehículo (i.v.) + Vehículo (i.p.) (control)	0,25 / 0,20	-
Vehículo (i.p.) + compuesto del Ej. 1 (20 mg/kg)	0,28 / 0,16	12
Vehículo (i.v.) + THC (3 mg/kg)	-0,13 / 0,30	-52
Vehículo (i.p.) + compuesto del Ej. 1 (20 mg/kg) + Vehículo (i.v.) + THC (3 mg/kg)	0,30 / 0,33	20

Los resultados resumidos en la tabla anterior muestran que la coadministración del compuesto del ejemplo 1 anula el efecto perjudicial del THC sobre la memoria.

5 Ejemplo 9: Determinación *in vivo* del efecto analgésico de los péptidos (prueba de la placa caliente)

Se usó el método descrito en "Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schütz G, Wotjak CT, Lutz B*, Marsicano G*. Genetic Dissection of Behavioural and Autonomic Effects of D9-tetrahydrocannabinol in Mice. PLOS Biology, 5(10):e269, 2007" con las ligeras modificaciones descritas en el presente documento para evaluar el efecto analgésico de los péptidos. Los resultados se resumen en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

	Latencia de lamido (s) Media / DE	Latencia de lamido % de aumento frente a control	Latencia de salto (s) Media / DE	Latencia de salto % de aumento frente a control
Vehículo (i.v.) + Vehículo (i.p.) (control)	10,38 / 2,97	-	51,1 / 20,09	-
Vehículo (i.p.) + compuesto del Ej. 1 (20 mg/kg)	13,90 / 7,29	33,9	56,40 / 16,22	10,4
Vehículo (i.v.) + THC (10 mg/kg)	21,20 / 10,37	104,2	87,60 / 58,13	71,4
Vehículo (i.p.) + compuesto del Ej. 1 (20 mg/kg) + Vehículo (i.v.) + THC (10 mg/kg)	18,78 / 9,90	80,9	67,11 / 20,99	31,3

Se midió la analgesia inducida por THC usando un medidor de analgesia de placa caliente (prueba de placa caliente/fría, Bioseb, EE. UU.) 60 minutos después de la inyección intraperitoneal (i.p.) de THC disuelto en un vehículo i.p. (5 % v/v de etanol, 5 % v/v de Cremophor-EL y solución salina al 90 % v/v) o inyección del vehículo (solución salina más DMSO al 2 %) solo y mediante inyección intravenosa 90 min después de la primera inyección del péptido que iba a someterse a prueba en un vehículo i.v. o del vehículo solo. La placa se calentó a $52 \pm 0,5$ °C y se registró el tiempo (en segundos) hasta que los ratones mostraron el lamido de las patas y la respuesta de salto sobre la placa (latencia de lamido y salto). Se estableció un tiempo umbral de 240 s para evitar daño tisular.

La coadministración del compuesto del ejemplo 1 con THC permite lograr un efecto analgésico sustancial.

Bibliografía

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

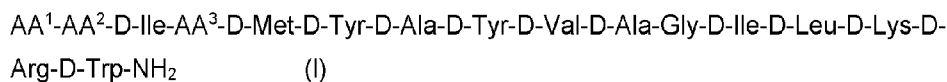
- Viñals X. *et al*; PLoS Biol. 9 Jul 2015;13(7):e1002194
- Kandasamy R, Dawson CT, Craft RM, Morgan MM. Anti-migraine effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the female rat. Eur J Pharmacol. 5 de enero de 2018;818:271-277. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.10.054. Epub 28 de octubre de 2017.
- Baron EP, Lucas P, Eades J, Hogue O. Patterns of medicinal cannabis use, strain analysis, and substitution effect among patients with migraine, headache, arthritis, and chronic pain in a medicinal cannabis cohort. Headache Pain. 24 de mayo de 2018;19(1):37. doi: 10.1186/s10194-018-0862-2.
- Russo EB. Clinical Endocannabinoid Deficiency Reconsidered: Current Research Supports the Theory in Migraine, Fibromyalgia, Irritable Bowel, and Other Treatment-Resistant Syndromes. Cannabis Cannabinoid Res. 1 de julio de 2016;1(1):154-165. doi: 10.1089/can.2016.0009. eCollection 2016.
- Miller S, Daily L, Leishman E, Bradshaw H, Straiker A. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Differentially Regulate Intraocular Pressure. Invest Ophthalmol Vis Sci. 3 de diciembre de 2018;59(15):5904-5911. doi: 10.1167/iov.18-24838.
- Escudero-Lara A, Argerich J, Cabanero D, Maldonado R. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) alleviates pelvic

hypersensitivity in a mouse model of endometriosis. IASP (International Association for the Study of Pain) 7th World Congress on Pain. Boston, EE. UU. 12-16 de septiembre de 2018, Abstract ID: 471100.

- 5 7. La Porta C, Bura SA, Llorente-Onaindia J, Pastor A, Navarrete F, Garcia-Gutiérrez MS, De la Torre R, Manzanares J, Monfort J, Maldonado R. Role of the endocannabinoid system in the emotional manifestations of osteoarthritis pain. *Pain*. Octubre de 2015;156(10):2001-12.
- 10 8. Maldonado R, Baños JE, Cabañero D. The endocannabinoid system and neuropathic pain. *Pain*. Febrero de 2016;157 Supl. 1:S23-32.
9. Engeli S. Central and peripheral cannabinoid receptors as therapeutic targets in the control of food intake and body weight. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(209):357-81. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3_17.
- 15 10. Al-Ghezi ZZ, Miranda K, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Combination of Cannabinoids, Δ9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol, Ameliorates Experimental Multiple Sclerosis by Suppressing Neuroinflammation Through Regulation of miRNA-Mediated Signaling Pathways. *Front Immunol*. 21 de agosto de 2019;10:1921.
- 20 11. Allen D. Dronabinol Therapy: Central Nervous System Adverse Events in Adults With Primary Brain Tumors. *Clin J Oncol Nurs*. 1 de febrero de 2019;23(1):23-26.
12. Buhmann C, Mainka T, Ebersbach G, Gandor F. Evidence for the use of cannabinoids in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Viena)*. Julio de 2019; 126(7):913-924.
- 25 13. Valdeolivas S, Sagredo O, Delgado M, Pozo MA, Fernández-Ruiz J. Effects of a Sativex-Like Combination of Phytocannabinoids on Disease Progression in R6/2 Mice, an Experimental Model of Huntington's Disease. *Int J Mol Sci*. 23 de marzo de 2017;18(4).
- 30 14. Donovan KA, Oberoi-Jassal R, Chang YD, Rajasekhara S, Haas MF, Randich AL, Portman DG. Cannabis Use in Young Adult Cancer Patients. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 22 de agosto de 2019. doi: 10.1089/jayao.2019.0039. [Publicación electrónica avance de la edición impresa]

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



en donde

AA¹ representa un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-triptófano (D-Trp), D-1-naftilalanina (D-1-Nal) y D-2-naftilalanina (D-2-Nal);

AA² representa un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-leucina (D-Leu), D-norleucina (D-Nle) y D-fenilalanina (D-Phe); y

AA³ representa un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-metionina (D-Met), D-tirosina (D-Tyr) y D-norleucina (D-Nle)

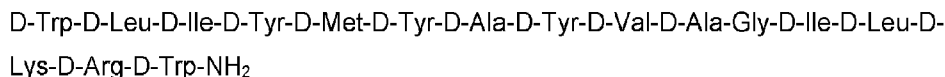
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde AA¹ representa D-triptófano (D-Trp).

3. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde AA² representa D-leucina (D-Leu).

4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde AA³ representa D-Tyr.

5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se selecciona del grupo que consiste en:



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

6. Una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con un agonista del receptor CB₁ seleccionado del grupo que consiste en 2-araquidonoilglicerol (2-AG), éter glicérido de 2-araquidonilo (2-AGE, éter noladín), anandamida (N-araquidonoiletanolamina o AEA), N-araquidonoil-dopamina, palmitoiletanolamida (PEA); 11-hidroxi-Δ⁸-tetrahidrocannabinol, 11-hidroxi-Δ⁹-tetrahidrocannabinol, cannabinoil, Δ⁸-tetrahidrocannabinol, Δ⁹-tetrahidrocannabinol (dronabinol, THC o Δ⁹-THC), AM-2201 (1-(5-fluoropentil)-3-(1-naftoil)indol), AM-678 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), araquidonoil-2'-cloroetilamida (ACEA), CP 55.940 ([(-)-cis-3-[2-hidroxi-4-(1,1-dimetilheptil)fenil]-trans-4-(3-hidroxipropil)-ciclohexanol]), HU-210, JWH-018 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), JWH-073, linoleil-etanolamida, levonantradol (CP 50.556-1), nabilona, nabiximoles y WIN 55.212-2, y mezclas de los mismos para su uso como un medicamento.

8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con un agonista del receptor CB₁ seleccionado del grupo que consiste en 2-araquidonoilglicerol (2-AG), éter glicérido de 2-araquidonilo (2-AGE, éter noladín), anandamida (N-araquidonoiletanolamina o AEA), N-araquidonoil-dopamina, palmitoiletanolamida (PEA); 11-hidroxi-Δ⁸-tetrahidrocannabinol, 11-hidroxi-Δ⁹-tetrahidrocannabinol, cannabinoil, Δ⁸-tetrahidrocannabinol, Δ⁹-tetrahidrocannabinol (dronabinol, THC o Δ⁹-THC), AM-2201 (1-(5-fluoropentil)-3-(1-naftoil)indol), AM-678 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), araquidonoil-2'-cloroetilamida (ACEA), CP 55.940 ([(-)-cis-3-[2-hidroxi-4-(1,1-dimetilheptil)fenil]-trans-4-(3-hidroxipropil)-ciclohexanol]), HU-210, JWH-018 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), JWH-073, linoleil-etanolamida, levonantradol (CP 50.556-1), nabilona, nabiximoles y WIN 55.212-2, y mezclas de los mismos para su uso en el tratamiento o la prevención en un animal, incluyendo un ser humano, de una enfermedad o afección susceptible de mejora por agonismo del receptor CB₁.

9. Una combinación para uso según la reivindicación 8, en donde la enfermedad o afección susceptible de mejora por agonismo del receptor CB₁ se selecciona del grupo que consiste en dolor asociado con migrañas graves, artrosis, endometriosis, artritis reumatoide, fibromialgia, dolor de espalda, dolor de rodilla, dolor neuropático de origen periférico o central, tratamiento orexígeno, como antiemético durante la quimioterapia, para el tratamiento del glaucoma, en el tratamiento de la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple y en el tratamiento de trastornos del movimiento incluyendo entre otros discinesias y enfermedad de Parkinson.

10. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con un agonista del receptor

CB₁ seleccionado del grupo que consiste en 2-araquidonoilglicerol (2-AG), éter glicerílico de 2-araquidonilo (2-AGE, éter noladín), anandamida (N-araquidonoiletanolamina o AEA), N-araquidonoil-dopamina, palmitoiletanolamida (PEA); 11-hidroxi- Δ 8-tetrahidrocannabinol, 11-hidroxi- Δ 9-tetrahidrocannabinol, cannabinol, Δ 8-tetrahidrocannabinol, Δ 9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, THC o Δ 9-THC), AM-2201 (1-(5-fluoropentil)-3-(1-naftoil)indol), AM-678 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA), CP 55.940 ([(-)-cis-3-[2-hidroxi-4-(1,1-dimetilheptil)fenil]-trans-4-(3-hidroxipropil)-ciclohexanol]), HU-210, JWH-018 (1-pentil-3-(1-naftoil)indol), JWH-073, linoleil-etanolamida, levonantradol (CP 50.556-1), nabilona, nabiximoles y WIN 55.212-2, y mezclas de los mismos para su uso en la reducción del deterioro de la memoria y/o alteraciones de ansiedad provocadas por el agonista del receptor CB₁.

11. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en donde la enfermedad o afección susceptible de mejora por agonismo del receptor CB₁ es dolor.
12. El compuesto para uso según la reivindicación 11, en donde el dolor es dolor crónico.
13. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 y 11 a 12, en donde el dolor está asociado con migrañas graves, artrosis, endometriosis, artritis reumatoide, fibromialgia, dolor de espalda, dolor de rodilla y dolor neuropático de origen periférico o central.
14. El compuesto para uso según la reivindicación 8, en donde el tratamiento de la enfermedad o afección susceptible de mejora por agonismo del receptor CB₁ es un tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en anorexia, vómitos provocados por quimioterapia en el tratamiento del cáncer, glaucoma, espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple y trastornos del movimiento incluyendo, entre otros, enfermedad de Huntington, discinesias y enfermedad de Parkinson.

FIGURA 1

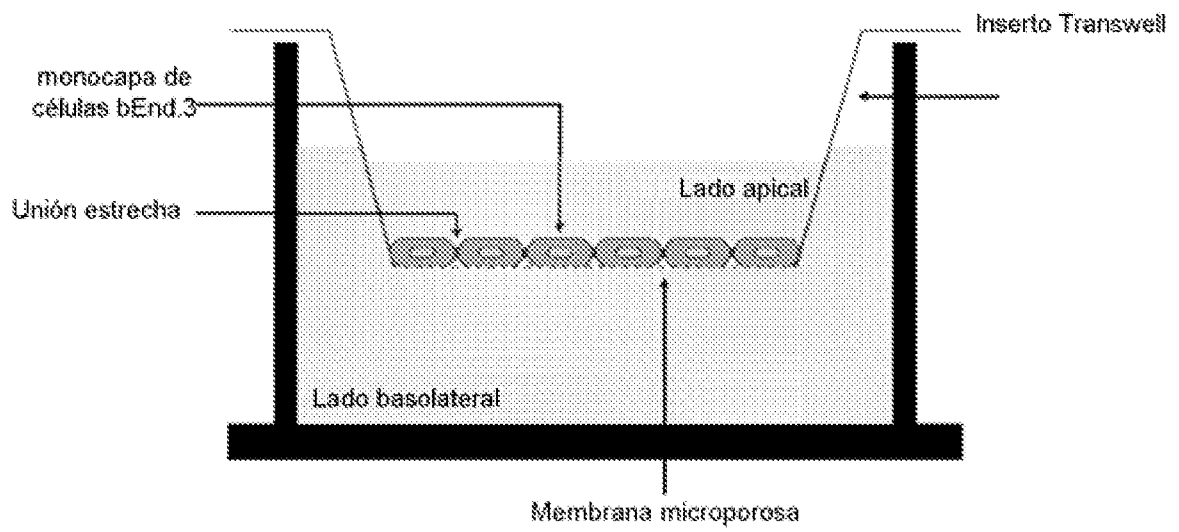


FIGURA 2

