

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 103**

51 Int. Cl.:

A61K 31/57 (2006.01)

A61P 25/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2019** **PCT/EP2019/054217**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2019** **WO19162328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2019** **E 19705190 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 3755339**

54 Título: **3-beta-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con los cannabinoides**

30 Prioridad:

20.02.2018 EP 18305177

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

03.06.2024

73 Titular/es:

AELIS FARMA (33.3%)
1 rue Lafaurie de Monbadon
33000 Bordeaux, FR;
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%) y
UNIVERSITE DE BORDEAUX (33.3%)

72 Inventor/es:

PIAZZA, PIER VINCENZO;
FABRE, SANDY;
METNA, MATHILDE;
MONLEZUN, STÉPHANIE;
BUSQUET-GARCIA, ARNAU;
COTA, DANIELA;
MARSICANO, GIOVANNI;
REVEST, JEAN-MICHEL y
VALLÉE, MONIQUE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 971 103 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

3-beta-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con los cannabinoides

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere al campo de los trastornos por consumo de sustancias y, en particular, al campo de los trastornos relacionados con los cannabinoides. Se relaciona con un derivado de pregnenolona particular, "3β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona", que no se puede metabolizar *in vivo* en metabolitos activos de pregnenolona y su uso para el tratamiento de trastornos relacionados con los cannabinoides.

10

Estado de la técnica

15 Preparación de cannabinoides que contiene agonistas de CB1 sintéticos o extracto derivado de la planta *Cannabis sativa*, son las sustancias psicoactivas ilícitas más consumidas en los Estados Unidos y en los países europeos.

Las consecuencias del consumo de cannabinoides, especialmente pero no limitadas a la población más propensa (entre 14 y 25 años), son extremadamente graves y pueden incluir adicción, desarrollo cerebral alterado con coeficiente intelectual reducido, precipitación de enfermedades psiquiátricas que incluyen, aunque no de forma limitativa, esquizofrenia y depresión, ingreso de los sujetos en Urgencias por diferentes síndromes de intoxicación, peores resultados educativos, deterioro cognitivo, bajos ingresos, mayor dependencia de prestaciones sociales, desempleo y menor relación y satisfacción con la vida ("Substance Abuse and Mental Health Services Administration (2013). Results from the 2013 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings"; Cerdá *et al.*, 2012; Volkow *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2009).

En los Estados Unidos, la prevalencia a 12 meses de la adicción a los cannabinoides, como se define en uno de los manuales de diagnóstico más utilizados de trastorno por consumo de cannabis, es aproximadamente del 3,4 % entre los jóvenes de 12 a 17 años y del 1,5 % entre los adultos de 18 años o más. Las tasas de trastorno por consumo de cannabinoides son mayores entre los hombres adultos (2,2 %) que entre las mujeres adultas (0,8 %) y entre los hombres de 12 a 17 años (3,8 %) que entre las mujeres de 12 a 17 años (3,0 %). Las tasas de prevalencia de doce meses de trastornos por consumo de cannabinoides entre adultos disminuyen con la edad, con tasas más altas entre las personas de 18 a 29 años (4,4 %) y más bajas entre las personas de 65 años o más (0,01 %). Las diferencias étnicas y raciales en la prevalencia son moderadas. El consumo de cannabinoides también es responsable en los EE. UU. de 450.000 visitas a urgencias al año (informe DAWN, 2013). En estos pacientes se observan varios tipos de síntomas. Los más comunes son: a. estado de ansiedad profunda que se aproxima a un ataque de pánico; b. psicosis, delirio y un comportamiento profundamente desorganizado; c. un síndrome de hiperemesis; d. comportamiento catatónico (Adams *et al* 2017, Khan *et al.*, 2016).

Finalmente, el consumo de cannabinoides está aumentando y seguirá aumentando con la legalización del consumo de cannabis medicinal y recreativo en los países occidentales, con una prevalencia superior al 30 % en EE. UU. y la mayoría de los países europeos para individuos entre 16 y 24 años. Aproximadamente el 9 % de quienes consumen cannabis se volverán adictos. La cifra aumenta a aproximadamente 1 de cada 6 entre quienes comienzan a consumir marihuana en la adolescencia y entre el 25 y el 50 % entre quienes fuman marihuana a diario.

Los trastornos relacionados con los cannabinoides se deben principalmente a la activación del receptor CB1 por Δ⁹-tetrahidrocannabinol (THC), el principal ingrediente psicoactivo del cannabis o por cualquier otro compuesto sintético, como los cannabinoides sintéticos.

Métodos destinados a bloquear la actividad del CB1 mediante la inhibición del sitio de unión ortostérico, el sitio en el que se unen los ligandos endógenos para activar el receptor, han sido desarrollados y presentados para ensayos clínicos para la reducción del peso corporal. Uno de estos compuestos, rimonabant, incluso se ha comercializado con la marca Acomplia®. Desafortunadamente, los antagonistas ortostéricos disponibles, tales como el rimonabant, inhiben toda la actividad del receptor y también actúan como agonistas inversos del receptor CB1, es decir, no sólo inhiben la activación del CB1, sino también la actividad basal del receptor en ausencia del ligando endógeno. Debido a esta acción agonista inversa y a la inhibición total de la actividad del receptor, los métodos disponibles basados en la administración de antagonistas ortostéricos de CB1 también tienen una serie de efectos adversos graves. Debido a estos efectos adversos, se ha suspendido la comercialización de Acomplia® y se ha detenido el desarrollo de otros métodos para inhibir el sitio ortostérico del CB1.

Los antagonistas ortostéricos de CB1 y, en particular, Acomplia® tienen los siguientes efectos adversos conocidos que los convierten en herramientas poco prácticas para tratar los trastornos relacionados con los cannabinoides:

1. Reducen la ingesta de alimentos, lo que indica una alteración general del sistema de recompensa;
2. Inducen comportamientos relacionados con la ansiedad en los animales y la ansiedad en los seres humanos;
3. Inducen comportamientos relacionados con la depresión en animales y la depresión en seres humanos;

65

4. Aumentan la secreción de glucocorticoides induciendo un deterioro del estado hormonal del sujeto. En particular, un aumento de glucocorticoides puede aumentar la actividad del sistema dopaminérgico que media los efectos gratificantes de las drogas de abuso, incluidos los cannabinoides. Un aumento de la secreción de glucocorticoides puede dar como resultado una mayor sensibilidad a los efectos gratificantes de los cannabinoides, lo que puede contrarrestar los efectos terapéuticos del inhibidor de CB1 en los trastornos relacionados con los cannabinoides;
5. Precipitan la abstinencia en animales dependientes del THC;
6. Inducen convulsiones y un deterioro clínico y conductual general en los estudios de toxicología y farmacología de seguridad de BPL;
7. Tienen efectos hepatotóxicos.

Recientemente se ha descubierto que cuando el receptor CB1 está sobreactivado por cannabinoides sintéticos o por dosis muy altas de THC, bastante superior a la dosis de THC utilizada por los adictos a cannabis, la concentración de la hormona esteroide pregnenolona aumenta (3.000 %) en el cerebro. A continuación, la pregnenolona se une a un sitio específico del receptor CB1, distinto del unido por agonistas de CB1 tal como el THC, y actúa como un inhibidor endógeno específico de señalización del receptor CB1 (eCB1-SSI). Por tanto, la pregnenolona inhibe selectivamente la activación inducida por CB1 de la vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), pero no la inhibición de la adenilato ciclasa inducida por CB1. A pesar de esta acción molecular restringida, cuando se administra pregnenolona antes de la exposición al THC, inhibe la mayoría de los efectos conductuales mediados por el THC en roedores (Vallée *et al.*, 2014).

Busquets-García *et al.* también demuestran que la pregnenolona puede bloquear toda la gama de efectos incondicionados del THC que están relacionados con síntomas psicóticos que se observan después del consumo de cannabinoides en seres humanos. Lo que sugiere que los fármacos que imitan la actividad de la pregnenolona podrían usarse para tratar estados psicóticos agudos inducidos por cannabinoides (CIAPS) (Busquets-García *et al.*, 2017).

Por estas razones, la pregnenolona parece ser un tratamiento prometedor para los trastornos relacionados con los cannabinoides.

No obstante, la pregnenolona no se puede utilizar como tratamiento farmacológico porque está poco disponible, tiene una semivida muy corta y se convierte posteriormente en esteroides activos.

En el documento WO2012/160006, tres derivados de la pregnenolona, a saber, 3-fluoropregnenolona, 17-metilpregnenolona, 3-fluoro-17-metilpregnenolona, se han probado en ratas o ratones después de estimulación con THC y/o después de privación de alimentos. Estos compuestos fueron capaces de inhibir los efectos de la activación de CB1 sobre la ingesta de alimentos.

Se probó la capacidad de inhibir de otros compuestos, y principalmente de la 3 β -benciloxipregnenolona: i. efectos de la tetrada de cannabinoides inducida por THC (disminución de la temperatura corporal y de la actividad locomotora); ii. Aumento de la ingesta de alimentos inducido por THC, un efecto típico de la activación de CB1; iii. el aumento de TNF α inducido por LPS, otro efecto típico de los antagonistas de CB1.

El documento WO2014/083068 divulga "3 β -(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona" y su uso para inhibir el receptor CB1, sin embargo, de una manera muy general. No se menciona la inhibición de la activación de CB1 causada por el THC en particular.

No obstante, no existen tratamientos farmacológicos aprobados para los trastornos relacionados con los cannabinoides, lo que, en consecuencia, constituye una importante necesidad médica insatisfecha.

En consecuencia, sigue siendo necesario el tratamiento de los trastornos relacionados con los cannabinoides.

El desarrollo de un tratamiento de los trastornos relacionados con los cannabinoides basado en una inhibición específica de señalización del receptor CB1 que pueda usarse en seres humanos presenta varios desafíos. Por tanto, dicho compuesto debe presentar concomitantemente todas las siguientes características:

1. Debe inhibir la actividad del receptor CB1 de forma selectiva y específica a señalización.
2. Debería inhibir un amplio espectro de efectos conductuales condicionados e incondicionados de los agonistas de CB1 para que sea útil en el tratamiento de los diferentes trastornos relacionados con los cannabinoides. Este es un desafío particular para un inhibidor específico de señalización. Dado que este compuesto modifica sólo ciertos efectos celulares de la activación del CB1 por un agonista. Por consiguiente, es imposible predecir cuál, entre los diferentes efectos conductuales de los cannabinoides, será modificado por un inhibidor específico de señalización.
3. Debe estar desprovisto de los efectos adversos conocidos de los inhibidores de CB1. En particular no debe inducir: a. una disminución de la ingesta de alimentos; b. un aumento de los comportamientos relacionadas con la ansiedad y la depresión; c. un aumento de la secreción de glucocorticoides; d. abstinencia en animales dependientes de THC; e. convulsiones y deterioro de los signos clínicos relacionados con el sistema nervioso central; f. hepatotoxicidad.

4. No debe tener efectos conductuales inespecíficos incluidos, aunque no de forma limitativa, sedación, excitabilidad, comportamiento espontáneo alterado que puede interferir con sus efectos terapéuticos.
 5. Debe absorberse bien, ser estable y no debe transformarse *in vivo*, en cantidades significativas de metabolitos posteriores que pueden tener efectos adversos, incluidos, aunque no de forma limitativa, esteroides activos.
 6. Debe acceder al cerebro que es el órgano objetivo de una herramienta terapéutica destinada a tratar los trastornos relacionados con los cannabinoides.
 7. No debe modificar las principales enzimas metabólicas del cuerpo ni los transportadores que pueden inducir modificaciones en el nivel o la actividad de moléculas endógenas o fármacos terapéuticos exógenos.
 8. Debe tener un buen índice terapéutico (la relación entre la dosis activa y la dosis que presenta efectos adversos).
- Generalmente se considera que un índice terapéutico aceptable es al menos 10.

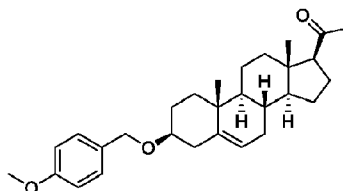
Para ninguno de los inhibidores específicos de señalización y otros antagonistas de los receptores CB1 descritos anteriormente o en el conocimiento previo disponible se han descrito todas las características mencionadas anteriormente. En términos más generales, prácticamente ningún compuesto utilizado para tratar los trastornos del comportamiento presenta todas estas características. Por tanto, las tres clases principales de drogas psicoactivas, ansiolíticos, antidepresivos y neurolépticos inducen efectos adversos conductuales en el intervalo de las dosis terapéuticas. Por ejemplo: a. Los ansiolíticos inducen somnolencia, disminuyen el estado de alerta y afectan a la memoria; b. El antidepresivo induce excitabilidad, insomnio y disminución de la libido; c. El neuroléptico induce alteración hormonal, sedación, discinesia y movimientos involuntarios.

Por consiguiente, un compuesto que tenga todas las características descritas en los puntos 1 a 8 no sólo sería una innovación importante para un fármaco diseñado para tratar los trastornos relacionados con los cannabinoides, sino también una innovación importante para todo el campo de los fármacos psicoactivos destinados a tratar los trastornos del comportamiento.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere generalmente a un derivado de pregnenolona específico para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con los cannabinoides.

Más particularmente, la invención se refiere a un compuesto de Fórmula (I)



Fórmula (I)

para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con los cannabinoides.

Efectivamente, el compuesto de la invención tiene la característica única de tener todas las propiedades descritas a continuación que lo convierte en una herramienta terapéutica muy innovadora para tratar los trastornos relacionados con los cannabinoides.

1. Inhibe selectivamente la actividad del receptor CB1 de manera específica a señalización;
2. Es muy potente para inhibir un amplio espectro de efectos conductuales condicionados e incondicionados de los agonistas de CB1 y, en consecuencia, puede ser útil para el tratamiento de trastornos relacionados con los cannabinoides;
3. Está desprovisto de los efectos adversos conocidos de los inhibidores y antagonistas de CB1. En particular, no:
 - a. disminuye la ingesta de alimentos;
 - b. aumenta los comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión;
 - c. aumenta la secreción de glucocorticoides;
 - d. precipita la abstinencia en animales dependientes de THC;
 - e. induce convulsiones y deterioro y signos clínicos relacionados con el sistema nervioso central;
 - f. induce toxicidad hepática en estudios de BPL.
4. No tiene efectos conductuales inespecíficos tales como sedación, excitabilidad, alteración del comportamiento espontáneo que podría interferir con su acción terapéutica.
5. Se absorbe bien, es estable y no se transforma en cantidades significativas en metabolitos posteriores.
6. Accede al cerebro.
7. No modifica las principales enzimas metabólicas y transportadores del cuerpo.
8. Tiene un excelente índice terapéutico >7.200.

Descripción de las figuras

FIGURA 1: Diagrama de flujo de la síntesis del compuesto de fórmula (I) (3pMBP)

FIGURAS 2: Efectos de 3pMBP *in vitro* sobre las modificaciones inducidas por THC de la señalización mediada por CB1 y las actividades celulares.

FIGURA 2A: Efecto de 3pMBP (0, 1, 10 y 100 nM) sobre la fosforilación de MAPK inducida por THC. Relación P-MAPK/CoxIV de células HEK293 transfectadas de manera estable con hCB1.

FIGURA 2B: Efecto de 3pMBP (0, 1, 10 y 100 nM) sobre la fosforilación de MAPK inducida por THC. Relación P-MAPK/MAPK de células HEK293 transfectadas de manera transitoria con hCB1.

FIGURA 2C: Efecto de 3pMBP (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM) sobre la disminución de los niveles de AMPc inducida por THC en células CHO transfectadas de manera estable con hCB1. NT= No tratado, es decir, células que recibieron tanto el vehículo de 3pMBP como de THC.

FIGURA 2D: Efecto de 3pMBP (0, 1, 10 y 100 nM) sobre la inhibición de la respiración celular inducida por THC en células HEK293 transfectadas de manera transitoria con hCB1.

***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05, grupos tratados con THC frente al grupo tratado con el vehículo de THC; ###p<0,001; ##p<0,01; #p<0,05, grupos tratados con 3pMBP+THC frente al grupo tratado con el vehículo de 3pMBP (0 nM)+THC. (A, B prueba de Tukey, D. Prueba de Dunnett).

FIGURAS 3: Efectos de 3pMBP sobre la hiperfagia inducida por THC, estimulación psicomotora y deterioro de la inhibición prepulso:

FIGURA 3A: 3pMBP (*per os*) previene de forma dependiente de la dosis en ratones el aumento de la ingesta de alimentos inducido por THC (1 mg/kg; ip).

***p<0,001, THC frente al vehículo de THC; ###p<0,001, 3pMBP+THC frente al Vehículo de 3pMBP (0 µg/kg) +THC (prueba de Dunnett).

FIGURA 3B: 3pMBP (*per os*) previene de forma dependiente de la dosis en ratones el aumento de la locomoción inducido por THC (0,3 mg/kg; ip).

Las líneas negras continuas corresponden a las medias; las líneas negras punteadas corresponden a los valores SEM de grupos tratados con el vehículo de THC (VEH) o con THC en ausencia de 3pMBP. Círculos negros, valores media ± SEM de los grupos tratados con 3pMBP y THC.

p>0,05, 3pMBP (0,0015 mg/kg)+THC frente al Vehículo de 3pMBP+THC,

p<0,01, 3pMBP (0,0005 mg/kg)+THC frente al Vehículo de 3pMBP+THC,

p<0,001, 3pMBP (0,0015 mg/kg)+THC, 3pMBP (0,015 mg/kg)+THC y 3pMBP (0,15 mg/kg)+THC frente al Vehículo de 3pMBP+THC.

(Prueba de Dunnett después de ANOVA unidireccional, p<0,001).

FIGURA 3C: 3pMBP (*per os*) previene de forma dependiente de la dosis en ratones el deterioro de la inhibición prepulso (82 dB) (IPP) inducida por THC (10 mg/kg; ip).

Las líneas negras continuas corresponden a las medias; las líneas negras punteadas corresponden a los valores SEM de grupos tratados con el vehículo de THC (VEH) o con THC en ausencia de 3pMBP. Círculos negros, valores media ± SEM de los grupos tratados con 3pMBP y THC.

p>0,05, 3pMBP (0,0015 mg/kg)+THC y 3pMBP (0,005 mg/kg)+THC frente al Vehículo de 3pMBP+THC,

p<0,05, 3pMBP (0,015 mg/kg)+THC y 3pMBP (0,05 mg/kg)+THC frente al Vehículo de 3pMBP+THC,

p<0,01, 3pMBP (0,03 mg/kg)+THC frente al Vehículo de 3pMBP+THC

(Prueba de Dunnett después de ANOVA unidireccional, p<0,001).

FIGURAS 4: Efectos de 3pMBP sobre los deterioros inducidos por THC de la memoria de trabajo, reconocimiento de objetos, interacción social y prueba de realidad.

FIGURA 4A: 3pMBP (*per os*) previene de forma dependiente de la dosis en ratones el deterioro de la memoria de trabajo inducido por THC (5 mg/kg) en el laberinto acuático. **p<0,01, THC frente al Vehículo de THC (VEH_{THC}; prueba de Dunnett). #p<0,05, 3pMBP+THC frente al Vehículo de 3pMBP (0 mg/kg)+THC (prueba de Dunnett).

FIGURA 4B: 3pMBP (*per os*) previene en ratones el deterioro del reconocimiento de objetos inducido por THC (6 mg/kg).

***p<0,001, Objeto familiares frente a novedoso (prueba de Sidak).

###p<0,001, tiempo de exploración del objeto novedoso: Vehículo 3pMBP (0 mg/kg) + THC frente al Vehículo 3pMBP (0 mg/kg) y sin THC o frente a 3pMBP+THC (prueba de Sidak).

FIGURA 4C: 3pMBP (*per os*) previene de forma dependiente de la dosis en ratones el deterioro de la interacción social inducido por el THC (3 mg/kg).

**p<0,01, THC frente al Vehículo de THC (VEH_{THC}; prueba de Dunnett).

$p < 0,001$; # $p < 0,05$, 3pMBP+THC frente al Vehículo de 3pMBP (0 mg/kg) + THC (prueba de Dunnett).

FIGURA 4D: 3pMBP (*per os*) previene de forma dependiente de la dosis en ratones el deterioro de la prueba de realidad inducido por THC (1 mg/kg).

* $p < 0,05$, THC frente al Vehículo de THC (VEH_{THC}; prueba de la t para muestras independientes).

FIGURAS 5: Efectos de 3pMBP sobre la catalepsia inducida por THC, apertura de boca ("gaping") condicionada y liberación de dopamina en el núcleo accumbens.

FIGURA 5A: 3pMBP (*per os*) reduce de forma dependiente de la dosis en ratones la catalepsia inducida por THC (10 mg/kg).

*** $p < 0,001$, THC frente al Vehículo de THC (prueba de Mann-Whitney).

$p < 0,05$, 3pMBP+THC frente al Vehículo de 3pMBP (0 mg/kg)+THC (prueba de Mann-Whitney).

FIGURA 5B: 3pMBP (*per os*) previene en ratones la abertura de boca condicionada inducida por THC (10 mg/kg). Número medio $\pm$ SEM de aperturas provocadas por la solución de sacarina emparejada con THC cuando se pretrata con 3pMBP (0,005 y 0,015 mg/kg) o Vehículo de 3pMBP (0 mg/kg) durante el condicionamiento y el ensayo de prueba.

* $p < 0,05$, 3pMBP+THC frente al Vehículo de 3pMBP (0 mg/kg)+THC (ANOVA unidireccional, efecto principal de la administración de 3pMBP).

FIGURA 5C: 3pMBP inhibe el aumento de la salida de dopamina con el tiempo en el núcleo accumbens de ratas tratadas con THC (1 mg/kg). Flecha negra, tiempo de inyección de THC.

FIGURA 5D: 3pMBP disminuye las áreas bajo la curva medias (ABC, calculadas a partir de tiempos "0" a 60 min para cada grupo) de la salida de dopamina en el núcleo accumbens de ratas tratadas con THC (1 mg/kg).

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, 3pMBP+THC frente al Vehículo de 3pMBP (0 mg/kg)+THC (prueba de Dunnett).

FIGURA 6: Efectos de 3pMBP sobre la autoadministración intravenosa de WIN 55,212-2 en ratones. 3pMBP (*per os*) disminuye la autoadministración de WIN 55,212-2 (0,0125 mg/kg/infusión; iv) en ratones. Número de infusiones durante la adquisición de la autoadministración (primeras 10 sesiones, círculos rellenos negros) y durante las sesiones de autoadministración con 3pMBP (0,005 mg/kg, sesiones 11-14 y 0,015 mg/kg, sesiones 15-18; cuadrados grises) o con Vehículo de 3pMBP (0 mg/kg, círculos rellenos blancos).

* $p < 0,05$, grupo tratado con 3pMBP (0,015 mg/kg) frente al Vehículo (0 mg/kg) (ANOVA bidireccional, efecto principal de la administración de 3pMBP).

FIGURAS 7 Efectos de 3pMBP sobre la autoadministración y el restablecimiento de THC en monos

FIGURA 7A: 3pMBP disminuye de forma dependiente de la dosis el número de inyecciones de THC en monos ardilla durante la autoadministración intravenosa (sesiones de 1 hora) de THC (4 μ g/kg/inyección) en una relación fija de diez (FR10)

* $p < 0,05$, frente al vehículo de 3pMBP + THC (prueba de Bonferroni).

FIGURA 7B: 3pMBP disminuye de forma dependiente de la dosis las tasas de respuesta de THC en monos ardilla durante la autoadministración intravenosa (sesiones de 1 hora) de THC (4 μ g/kg/inyección) en una relación fija de diez (FR10).

* $p < 0,05$, frente al vehículo de 3pMBP + THC (prueba de Bonferroni).

FIGURA 7C: 3pMBP (*per os*) reduce el restablecimiento de la búsqueda de droga inducida por THC (0,04 mg/kg) en monos. La barra representa la media $\pm$ SEM ($n = 4$) del número de inyecciones del vehículo. "0 mg/kg" representa vehículo de 3pMBP.

* $p < 0,05$, frente a "cebado del vehículo" (prueba de Tukey).

$p < 0,05$, frente a "cebado de THC", (Prueba de Tukey).

FIGURA 7D: 3pMBP (*per os*) reduce la tasa de respuestas durante la prueba de restablecimiento de la búsqueda de droga inducida por THC (0,04 mg/kg) en monos. La barra representa la media $\pm$ SEM ($n = 4$) de las tasas de respuesta. "0 mg/kg" representa vehículo de 3pMBP.

* $p < 0,05$, frente a "cebado del vehículo" (prueba de Tukey).

$p < 0,05$, frente a "cebado de THC", (Prueba de Tukey).

FIGURAS 8 Efectos de 3pMBP y rimonabant sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal y sobre la abstinencia inducida por THC.

FIGURA 8A: Efectos de 3pMBP y rimonabant sobre el peso corporal en ratones obesos.

En comparación con los animales tratados con vehículo (VEH), Rimonabant (Rimo 10 mg/kg; i.p.), pero no

3pMBP (0,005, 0,015, 0,05, 5 y 15 mg/kg; *per os*), disminuye el peso corporal en ratones obesos. Días 1 a 4: ningún efecto significativo de rimonabant.

Días 5 al 7: $p < 0,05$, Rimo frente a VEH (prueba de Dunnett).

Días 7 al 15: $p < 0,01$, Rimo frente a VEH (prueba de Dunnett).

FIGURA 8B: Efectos de 3pMBP y rimonabant sobre la ingesta de alimentos en ratones obesos.

En comparación con los animales tratados con vehículo (VEH), Rimonabant (Rimo 10 mg/kg; i.p.), pero no 3pMBP (0,005, 0,015, 0,05, 5 y 15 mg/kg; *per os*), disminuye la ingesta de alimentos en ratones obesos. Día 1 a 5: $p < 0,001$, Rimo frente a VEH (prueba de Tukey).

FIGURA 8C: Efectos de 3pMBP y rimonabant sobre la duración del movimiento de cabeza.

Rimonabant (Rimo, 10 mg/kg; i.p.), pero no 3pMBP (0,15 mg/kg; *per os*) aumenta la duración del movimiento de cabeza en ratones que recibieron un tratamiento repetido con administraciones de THC (20 mg/kg; ip) en comparación con animales tratados repetidamente con THC que recibieron una inyección de vehículo (VEH).

*** $p < 0,001$; Grupo VEH-THC frente al grupo Rimo-THC (prueba t de Student).

FIGURA 8D: Efectos de 3pMBP y rimonabant sobre la duración de los temblores de las patas.

Rimonabant (Rimo, 10 mg/kg; i.p.), pero no 3pMBP (0,15 mg/kg; *per os*) aumenta la duración de los temblores de las patas en ratones que recibieron un tratamiento repetido con THC (20 mg/kg; ip) en comparación con animales tratados repetidamente con THC que recibieron una inyección de vehículo (VEH).

* $p < 0,05$; Grupo VEH-THC frente al grupo Rimo-THC (prueba t de Student).

FIGURAS 9: Efectos de las administraciones repetidas de 3pMBP o rimonabant sobre comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión en ratones.

FIGURA 9A: Efectos en ratones de administraciones repetidas (28 días, una vez al día) de 3pMBP (0, 0,05, 5, 15 mg/kg, *per os*) o de rimonabant (Rimo 0 y 10 mg/kg; ip) sobre comportamientos relacionados con la ansiedad, medidos por el porcentaje de tiempo pasado en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz. 3pMBP no tiene ningún efecto sobre el tiempo pasado en los brazos abiertos, mientras que rimonabant disminuye el tiempo pasado en los brazos abiertos.

FIGURA 9B: Efectos en ratones de las administraciones repetidas (28 días, una vez al día) de 3pMBP (0, 0,05; 5; 15 mg/kg, *per os*) o de rimonabant (Rimo 0 y 10 mg/kg; ip) sobre comportamientos relacionados con la ansiedad, medidos por el porcentaje de visitas en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz. 3pMBP no tiene ningún efecto sobre las visitas en los brazos abiertos mientras que rimonabant disminuye el porcentaje de visitas en los brazos abiertos.

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Rimo frente a vehículo (0 mg/kg) (prueba t de Student).

FIGURA 9C: Efectos en ratones de las administraciones repetidas (28 días, una vez al día) de 3pMBP (0, 0,05; 5; 15 mg/kg, *per os*) sobre comportamientos relacionados con la depresión medidos en la prueba de preferencia de sacarosa. 3pMBP no tiene ningún efecto sobre la ingesta de sacarosa.

FIGURA 9D: Efectos en ratones de administraciones repetidas (28 días, una vez al día) de rimonabant (Rimo 0 y 10 mg/kg; ip) sobre comportamientos relacionados con la depresión medidos en la prueba de preferencia de sacarosa. Rimonabant disminuye la ingesta de sacarosa (retraso de 8:30 a 10 pm). * $p < 0,05$, Rimo frente a vehículo (0 mg/kg) (prueba t de Student).

FIGURAS 10: Efecto de 3pMBP sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona en ratones.

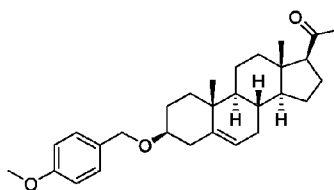
FIGURA 10A: En ratones macho, la administración de 3pMBP (0,3 o 10 mg/kg; *per os*) o vehículo (VEH) no tiene ningún efecto significativo sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona medidas 2, 5, 8 y 24 horas después de la administración.

FIGURA 10B: En ratones hembra, la administración de 3pMBP (0,3 o 10 mg/kg; *per os*) o vehículo (VEH) no tiene ningún efecto significativo sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona medidas 2, 5, 8 y 24 horas después de la administración.

Los datos se representan en escala log(10).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere generalmente a un compuesto de Fórmula (I):



Fórmula (I)

para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con los cannabinoides.

El compuesto de la presente invención, 3β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona, no bloquea toda la actividad del receptor objetivo, sino sólo una parte de su actividad. El receptor diana específico del compuesto de la presente invención es el receptor CB1.

El compuesto de Fórmula (I) es capaz de reproducir los efectos de un mecanismo cerebral recientemente descubierto que proporciona una retroalimentación negativa endógena, regulando una sobreactivación del CB1. Es importante señalar que este mecanismo regulador se activa sólo cuando CB1 está fuertemente sobreactivado, pero no cuando la activación del receptor está dentro de un intervalo más fisiológico. Esta es la razón por la que el compuesto de la presente invención es extremadamente potente para bloquear los efectos del THC, agonista de CB1, y, por tanto, es eficaz para el tratamiento de trastornos relacionados con los cannabinoides. Asimismo, debido a su mecanismo de acción específica de señalización, el compuesto de la presente invención no tiene efectos sobre el comportamiento en sí mismo en sujetos sanos en los que el CB1 no es activado por los cannabinoides.

El mecanismo de acción del compuesto de la presente invención es a este respecto muy diferente del de los antagonistas ortostéricos de CB1, que al bloquear la unión de agonistas endógenos y exógenos del receptor CB1, inducen una inhibición completa de toda la actividad de CB1 y alteran el comportamiento en sí mismo. Además, el mecanismo de acción de los antagonistas no existe fisiológicamente, es decir, por lo que saben los presentes inventores, no hay compuestos endógenos, que como antagonistas, bloqueen la unión de un agonista de CB1 al receptor. Debido a la naturaleza artificial de este mecanismo de acción, estos antagonistas, además de corregir una sobreactivación de un receptor objetivo, generalmente reduce su actividad por debajo de los niveles basales, alterando la fisiología y generando efectos secundarios.

El diferente mecanismo de acción entre el compuesto de la presente invención y los antagonistas ortostéricos, tales como rimonabant, explica por qué ambos fármacos pueden inhibir los efectos del THC, pero no comparten otros efectos conductuales.

Por lo tanto, el compuesto de la presente invención no es un antagonista de CB1 y como tal no bloquea todos los efectos celulares del THC, como lo hace el antagonista ortostérico de CB1 rimonabant. En realidad, el compuesto de la presente invención transforma el THC en un agonista del CB1 sesgado por AMPc.

Un agonista sesgado es un compuesto que es capaz de activar sólo algunos de los efectos celulares mediados por su receptor objetivo. En el caso de CB1, los dos efectos principales de un agonista, tal como THC, son simultáneamente inhibir la producción de AMPc y estimular la actividad de MAPK. Un agonista sesgado del CB1 podría entonces inhibir selectivamente el AMPc (agonista de CB1 sesgado por AMPc) o activar la MAPK (agonista de CB1 sesgado por MAPK). Cuando el compuesto de la presente invención está presente, el THC todavía puede inhibir la producción de AMPc, pero no activar MAPK.

Dicho de otro modo, el compuesto de la presente invención ha transformado el THC en un agonista sesgado por el AMPc.

Los datos preclínicos obtenidos con el compuesto de la presente invención indican que, como agonista sesgado por el AMPc, el THC pierde la mayoría de sus efectos conductuales condicionados e incondicionados, que se vuelve menos reforzador y capaz de restablecer la búsqueda de droga después de un período de interrupción de la droga.

No obstante, el THC todavía tiene algunos de sus efectos celulares. Probablemente esta sea la razón por la que el compuesto de la presente invención no precipita la abstinencia en ratones dependientes de THC, mientras que rimonabant sí.

De manera ventajosa, el compuesto de la presente invención no muestra los efectos conductuales de los antagonistas de CB1. Efectivamente, los antagonistas ortostéricos de CB1 bloquean toda la actividad celular de un receptor, mientras que el compuesto de la presente invención bloquea sólo algunos de ellos.

De manera aún ventajosa y más general, no se han observado efectos adversos con el compuesto de la presente invención.

La falta de efectos adversos, y en muchos casos, ningún efecto del compuesto de la presente invención en roedores y perros se debe probablemente a la estructura específica, el mecanismo de acción y las características de adsorción/distribución/metabolismo/excreción del compuesto de la presente invención.

Los inventores demuestran que el compuesto de la invención tiene características concomitantes que lo convierten en una herramienta ideal única para tratar los trastornos relacionados con los cannabinoides. Estas características incluyen, pero sin limitación:

1. El compuesto de la presente invención tiene un mecanismo de acción único diseñado como un mecanismo cerebral endógeno para superar una sobreactivación del receptor CB1, pero parece no tener ningún efecto sobre la actividad basal del receptor. La alteración de la actividad basal del sistema objetivo suele ser responsable de algunos de los efectos adversos de los antagonistas. Además, el compuesto de la presente invención es muy selectivo y no interactúa con ninguno de los 85 receptores probados. Los efectos inespecíficos suelen ser responsables de algunos de los efectos adversos de las nuevas entidades químicas. A continuación, se inhibe la actividad celular del receptor CB1 de forma selectiva y específica de señalización.
2. El compuesto de la presente invención muestra *in vivo* una potencia muy alta para inhibir un amplio espectro de efectos condicionados e incondicionados de los agonistas de CB1 que incluyen, pero sin limitación, THC.
3. El compuesto de la presente invención no tiene ninguno de los efectos adversos de los antagonistas ortostéricos de CB1, que incluyen, pero sin limitación: a. disminución de la ingesta de alimentos; b. aumento de comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión; c. aumento de la secreción de glucocorticoides; d. abstinencia precipitada en animales dependientes de THC; e. inducción de convulsiones clónicas y signos clínicos relacionados con un deterioro del sistema nervioso central; f. hepatotoxicidad.
4. El compuesto de la presente invención no provoca cambios relevantes en el comportamiento en sí mismo, incluso en dosis miles de veces superiores a la DI_{50} para la inhibición del THC.
5. El compuesto de la presente invención tiene buenas características de absorción, distribución, metabolismo y excreción sin conversión significativa en los metabolitos principales incluyendo, aunque no de forma limitativa, los esteroides activos posteriores.
6. El compuesto de la presente invención presenta un buen acceso al cerebro.
7. El compuesto de la presente invención no modifica la actividad de las principales enzimas metabólicas endógenas ni de los sistemas de transporte.
8. El compuesto de la presente invención no tiene efectos adversos ni tóxicos, *in vitro* e *in vivo*, en dosis miles de veces superiores a la DI_{50} para la inhibición de los efectos del THC. Por consiguiente, el compuesto de la presente invención tiene un muy buen índice terapéutico >7.200 .

De acuerdo con la presente invención, los "trastornos relacionados con los cannabinoides" o "trastorno relacionado con los cannabinoides" o "CRD" incluyen el trastorno por consumo de cannabinoides (CUD); intoxicación por cannabinoides; abstinencia de cannabinoides; otros trastornos inducidos por cannabinoides; trastorno relacionado con los cannabinoides no especificado; síndrome de hiperemesis por cannabinoides, catatonia inducida por cannabinoides y todos los trastornos que se pueden atribuir al consumo de cannabinoides.

Para ilustrar los principales trastornos relacionados con los cannabinoides (CRD) utilizamos en el presente documento los criterios de la quinta edición del "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders" (DSM-5™) que se refiere al cannabis y los cannabinoides sintéticos.

No obstante, esta no es una descripción exclusiva de los trastornos relacionados con los cannabinoides, sino que abarca trastornos similares descritos en otros manuales de diagnóstico que incluyen, aunque no de forma limitativa, la Clasificación Internacional de Enfermedades (Organización Mundial de la Salud) y, de manera más general, todos los trastornos inducidos por preparados derivados del cannabis o que contienen sustancias sintéticas cannabinoides.

Ejemplos de dichos trastornos se describen bien en la publicación de 2016 de la Organización Mundial de la Salud titulada "The health and social effects of nonmedical cannabis use". Los efectos a corto plazo del consumo de cannabinoides incluyen trastornos tales como deterioro de la cognición y la coordinación, ansiedad y síntomas psicóticos, toxicidad aguda, efectos cardiovasculares agudos y efectos agudos en los pulmones y las vías respiratorias. El consumo de cannabinoides a largo plazo implica no sólo resultados psicosociales y de salud mental adversos, sino también trastornos cardiovasculares relacionados con los cannabinoides y accidentes cerebrovasculares isquémicos relacionados con los cannabinoides.

El "trastorno por consumo de cannabinoides" o "CUD" debe entenderse como un patrón problemático de consumo de cannabinoides que conduce a un deterioro o malestar clínicamente significativo, como lo manifiestan al menos dos de los siguientes, ocurridos dentro de un período de 12 meses:

1. Los cannabinoides suelen consumirse en cantidades mayores o durante un período más largo de lo previsto.
2. Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos por reducir o controlar el consumo de cannabinoides.
3. Se dedica una gran cantidad de tiempo a actividades necesarias para obtener cannabinoides, consumir cannabinoides o recuperarse de sus efectos.

4. Ansia, o un fuerte deseo o necesidad de consumir cannabinoides.
5. El consumo recurrente de cannabinoides da como resultado el incumplimiento de obligaciones importantes en el trabajo, escuela o casa.
6. Consumo continuo de cannabinoides a pesar de tener problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes causados o exacerbados por los efectos de los cannabinoides.
7. Se abandonan o reducen importantes actividades sociales, ocupacionales o recreativas debido al consumo de cannabinoides.
8. Consumo recurrente de cannabinoides en situaciones en las que son físicamente peligrosas.
9. Se continúa el consumo de cannabinoides a pesar de saber que tiene un problema físico o psicológico persistente o recurrente que probablemente haya sido causado o exacerbado por los cannabinoides.
10. Tolerancia, como se define por cualquiera de los siguientes:

- a. Una necesidad de cantidades notablemente mayores de cannabinoides para lograr la intoxicación o el efecto deseado.
- b. Efecto notablemente disminuido con el consumo continuado de la misma cantidad de cannabinoides.

11. Abstinencia, como se manifiesta por cualquiera de los siguientes:

- a. El síndrome de abstinencia característico de los cannabinoides.
- b. Los cannabinoides (o una sustancia estrechamente relacionada) se toman para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.

De acuerdo con el DSM-5™, El trastorno por consumo de cannabinoides, se considerará "leve" si se presentan de 2 a 3 síntomas, "moderado" si se presentan de 4 a 5 síntomas y "grave" si se presentan 6 o más síntomas.

Como se usa en el presente documento, La "intoxicación por cannabinoides" se debe diagnosticar con los siguientes criterios:

- A. Consumo reciente de cannabis o de un cannabinoide sintético.
- B. Cambios conductuales o psicológicos problemáticos clínicamente significativos (por ejemplo, coordinación motora deteriorada, euforia, ansiedad, sensación de tiempo ralentizado, deterioro del juicio, retraimiento social) que se desarrolló durante, o poco después, del consumo de cannabinoides.
- C. Dos (o más) de los siguientes signos o síntomas se desarrollan dentro de las 2 horas posteriores al consumo de cannabinoides:

1. Inyección conjuntival.
2. Aumento del apetito.
3. Boca seca.
4. Taquicardia.

- D. Los signos o síntomas no son atribuibles a otra afección médica y no se explican mejor por otro trastorno mental, incluida la intoxicación por otra sustancia.

El término "trastorno de abstinencia de cannabinoides" debe diagnosticarse con los siguientes criterios:

- A. Cese del consumo de cannabinoides que ha sido intenso y prolongado (es decir, consumo habitualmente diario o casi diario durante un período de al menos unos pocos meses).
- B. Tres (o más) de los siguientes signos y síntomas se desarrollan aproximadamente 1 semana después del Criterio A:

1. Irritabilidad, ira o agresión.
2. Nerviosismo o ansiedad.
3. Dificultad para dormir (por ejemplo, insomnio, sueños perturbadores).
4. Disminución del apetito o pérdida de peso.
5. Agitación.
6. Estado de ánimo deprimido.
7. Al menos uno de los siguientes síntomas físicos que causan un malestar significativo: dolor abdominal, convulsiones/temblores, sudoración, fiebre, escalofríos o dolor de cabeza.

- C. Los signos o síntomas del Criterio B causan malestar o deterioro clínicamente significativo en las áreas sociales, laborales u otras áreas importantes del funcionamiento.

- D. Los signos o síntomas no son atribuibles a otra afección médica y no se explican mejor por otro trastorno mental, incluyendo intoxicación o abstinencia de otra sustancia.

De acuerdo con el DSM-5™ los "Otros trastornos inducidos por cannabinoides" son el trastorno de ansiedad inducido por cannabinoides; trastorno psicótico inducido por cannabinoides; trastorno del sueño inducido por cannabinoides;

delirio por intoxicación por cannabinoides. Estos trastornos inducidos por cannabinoides se diagnostican en lugar de la intoxicación por cannabinoides o la abstinencia de cannabinoides cuando los síntomas son lo suficientemente graves como para justificar una atención clínica independiente.

5 El "trastorno psicótico inducido por cannabinoides" debe diagnosticarse con los siguientes criterios:

A. Presencia de uno o ambos de los siguientes síntomas:

- 10 1. Delirios.
2. Alucinaciones.

B. Hay evidencia a partir del historial, examen físico o hallazgos de laboratorio de (1) y (2):

- 15 1. Los síntomas del Criterio A se desarrollaron durante o poco después de la intoxicación o abstinencia de cannabinoides o después de la exposición a un medicamento.
2. Los cannabinoides involucrados son capaces de producir los síntomas del Criterio A.

20 C. La alteración no se explica mejor por un trastorno psicótico que no sea inducido por sustancias. Dicha evidencia de un trastorno psicótico independiente podría incluir lo siguiente:

Los síntomas precedieron al inicio del consumo de cannabinoides; los síntomas persisten durante un período de tiempo sustancial (por ejemplo, aproximadamente 1 mes) después del cese de la abstinencia aguda o de la intoxicación grave; o hay otra evidencia de un trastorno psicótico independiente no inducido por sustancias o medicamentos (por ejemplo, antecedentes de episodios recurrentes no relacionados con sustancias o medicamentos).

25 D. La alteración no ocurre exclusivamente durante el curso de un delirio.

E. La alteración causa malestar clínicamente significativo o deterioro en las áreas sociales, laborales u otras áreas importantes del funcionamiento.

30 Este diagnóstico debe realizarse en lugar de un diagnóstico de intoxicación o abstinencia de sustancias sólo cuando los síntomas del Criterio A predominen en el cuadro clínico y cuando sean lo suficientemente graves como para justificar atención clínica.

El "trastorno de ansiedad inducido por cannabinoides" se debe diagnosticar con los siguientes criterios:

35 R. En el cuadro clínico predominan los ataques de pánico o ansiedad.
B. Hay evidencia a partir del historial, examen físico o hallazgos de laboratorio de (1) y (2):

- 40 1. Los síntomas del Criterio A se desarrollaron durante o poco después de la intoxicación o abstinencia de cannabinoides o después de la exposición a los cannabinoides.
2. Los cannabinoides involucrados son capaces de producir los síntomas del Criterio A.

C. La alteración no se explica mejor por un trastorno de ansiedad que no sea inducido por cannabinoides. Dicha evidencia de un trastorno de ansiedad independiente podría incluir lo siguiente:

45 Los síntomas preceden al inicio del consumo de la sustancia/medicamento; los síntomas persisten durante un período de tiempo sustancial (por ejemplo, aproximadamente 1 mes) después del cese de la abstinencia aguda o de la intoxicación grave; o hay otra evidencia que sugiere la existencia de un trastorno de ansiedad independiente no inducido por sustancias o medicamentos (por ejemplo, antecedentes de episodios recurrentes no relacionados con sustancias o medicamentos).

50 D. La alteración no ocurre exclusivamente durante el curso de un delirio.

E. La alteración causa malestar clínicamente significativo o deterioro en las áreas sociales, laborales u otras áreas importantes del funcionamiento.

55 Nota: Este diagnóstico debe realizarse en lugar de un diagnóstico de intoxicación por cannabinoides o abstinencia de cannabinoides solo cuando los síntomas del Criterio A predominen en el cuadro clínico y sean lo suficientemente graves como para justificar atención clínica.

El "trastorno del sueño inducido por cannabinoides" se debe diagnosticar con los siguientes criterios:

60 A. Una alteración importante y grave del sueño.

B. Hay evidencia a partir del historial, examen físico o hallazgos de laboratorio de (1) y (2):

- 65 1. Los síntomas del Criterio A se desarrollaron durante o poco después de la intoxicación por cannabinoides o después de la abstinencia o exposición a los cannabinoides.
2. Los cannabinoides involucrados son capaces de producir los síntomas del Criterio A.

C. La alteración no se explica mejor por un trastorno del sueño que no sea inducido por cannabinoides. Dicha evidencia de un trastorno del sueño independiente podría incluir lo siguiente:

Los síntomas preceden al inicio del consumo de cannabinoides; los síntomas persisten durante un período de tiempo sustancial (por ejemplo, aproximadamente 1 mes) después del cese de la abstinencia aguda o de la intoxicación grave; o hay otra evidencia que sugiere la existencia de un trastorno del sueño independiente no inducido por cannabinoides (por ejemplo, antecedentes de episodios recurrentes no relacionados con sustancias o medicamentos).

D. La alteración no ocurre exclusivamente durante el curso de un delirio.

E. La alteración causa malestar clínicamente significativo o deterioro en las áreas sociales, laborales u otras áreas importantes del funcionamiento.

Nota: Este diagnóstico debe realizarse en lugar de un diagnóstico de intoxicación por cannabinoides o abstinencia de cannabinoides solo cuando los síntomas del Criterio A predominen en el cuadro clínico y cuando sean lo suficientemente graves como para justificar atención clínica.

El "delirio por intoxicación" debe diagnosticarse con los siguientes criterios:

A. Una alteración en la atención (es decir, capacidad reducida para dirigir, centrar, mantener y cambiar la atención) y la conciencia (orientación reducida hacia el entorno).

B. La alteración se desarrolla durante un corto período de tiempo (generalmente de unas horas a unos pocos días), representa un cambio con respecto a la atención y la conciencia inicial y tiende a fluctuar en gravedad durante el transcurso del día.

C. Una alteración adicional en la cognición (por ejemplo, déficit de memoria, desorientación, idioma, capacidad visuoespacial o percepción).

D. Las alteraciones de los Criterios A y C no se explican mejor por otro trastorno neurocognitivo preexistente, establecido o en evolución y no ocurren en el contexto de un nivel de despertar severamente reducido, tal como coma.

E. Hay evidencia a partir del historial, examen físico o hallazgos de laboratorio de que la alteración es una consecuencia fisiológica directa de la intoxicación o abstinencia de cannabinoides.

Se debe realizar un diagnóstico de delirio por intoxicación por cannabinoides en lugar de intoxicación por cannabinoides cuando los síntomas de los criterios A y C predominen en el cuadro clínico y cuando sean lo suficientemente graves como para justificar atención clínica.

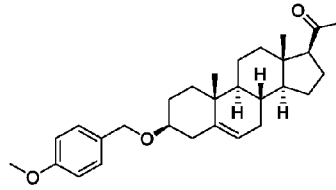
Se debe realizar un diagnóstico de delirio por abstinencia de cannabinoides en lugar de abstinencia de sustancias cuando los síntomas de los Criterios A y C predominen en el cuadro clínico y cuando sean lo suficientemente graves como para justificar atención clínica.

Como se utiliza en el presente documento, y de acuerdo con el DSM-5™ la categoría de "trastorno relacionado con los cannabinoides no especificado" se aplica a presentaciones en las que se presentan síntomas característicos de un trastorno relacionado con los cannabinoides que causan malestar o deterioro clínicamente significativo en las áreas sociales, ocupacionales u otras áreas importantes de funcionamiento, pero no cumplen con todos los criterios para ningún trastorno relacionado con los cannabinoides específico o ninguno de los trastornos en la clase de diagnóstico de trastornos relacionados con sustancias y adictivos.

Como se utiliza en el presente documento, "síndrome de hiperemesis por cannabinoides" se aplica a presentaciones caracterizadas por el consumo de cannabinoides, episodios cíclicos de náuseas y vómitos a menudo asociados con baños calientes frecuentes. El curso clínico del síndrome de hiperemesis por cannabinoides se puede dividir en tres fases: fase prodrómica, hiperemética y de recuperación. La fase hiperemética suele cesar en 48 horas. Los pacientes a menudo demuestran la conducta aprendida de baños calientes frecuentes, que produce el cese temporal de náuseas, vómitos y dolor abdominal (Galli *et al.*, 2011).

Como se utiliza en el presente documento, "catatonia inducida por cannabinoides" se aplica a presentaciones caracterizadas por el consumo de cannabinoides seguido de un estado similar a catatónico, con movilidad reducida, estado de alerta y capacidad de respuesta a la estimulación externa como sintomatología clínica predominante (Adams *et al* 2017, Khan *et al.*, 2016).

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (I):



Fórmula (I)

5 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con los cannabinoides seleccionado entre trastorno por consumo de cannabinoides (CUD); intoxicación por cannabinoides; abstinencia de cannabinoides; otros trastornos inducidos por cannabinoides, trastorno relacionado con los cannabinoides no especificado; síndrome de hiperemesis por cannabinoides y catatonía inducida por cannabinoides.

10 Como se usa en el presente documento, los "cannabinoides" se refieren a sustancias que son agonistas totales o parciales que actúan sobre los receptores cannabinoides. Los cannabinoides incluyen extractos naturales y compuestos sintéticos, también conocidos como sustancias similares al cannabis.

Se han descrito dos tipos principales de receptores cannabinoides (CB): receptores CB1 y CB2.

15 Normalmente, los cannabinoides naturales podrían extraerse de la planta *Cannabis* L., en particular, *Cannabis sativa*.

20 Con el paso del tiempo, el material vegetal obtenido de la planta *Cannabis* L. ha acumulado muchos nombres (por ejemplo, marihuana, mota, hierba, pasto, canuto, María Juana, porro, maría, cáñamo, greña, boom, gángster, kif y grifa). Los consumidores de cannabinoides pueden ingerir partes de la planta, por ejemplo, la flor o las hojas, o distintos tipos de extracciones concentradas de la planta de las cuales uno de los más utilizados es el hachís. Los componentes de las plantas o los extractos vegetales suelen fumarse o ingerirse con varias preparaciones alimenticias.

25 El cannabis es una planta psicoactiva que contiene más de 500 componentes, de los cuales actualmente se han identificado 104 cannabinoides.

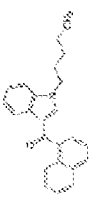
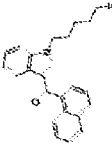
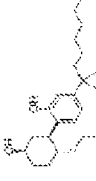
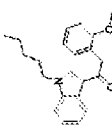
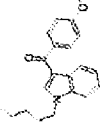
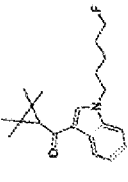
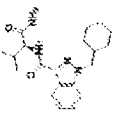
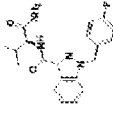
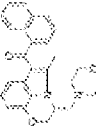
30 El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) es el principal componente psicoactivo de la planta de cannabis. La potencia del cannabis se evalúa principalmente de acuerdo con la concentración de THC. Por esta razón, se puede comprar un extracto que contiene THC puro (pure gold) y lo utilizan los consumidores de cannabinoides. Los efectos adversos después del consumo agudo o regular de cannabis están en relación directa con las concentraciones de THC en el producto (Lafaye *et al.*, 2017).

35 El Cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabavarina (THCV), cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), delta-8-THC, cannabiciol (CBL), cannabitriol (CBT) y la cannabielsoína se encuentran entre los muchos cannabinoides naturales diferentes que contiene la planta de cannabis. Se sabe que la mayoría tiene propiedades psicoactivas.

Los cannabinoides sintéticos se unen a los receptores cannabinoides y provocan efectos similares al Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC). Algunos ejemplos de cannabinoides sintéticos se describen, sin limitación, en la Tabla 1.

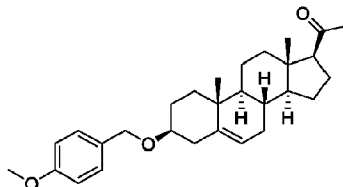
40 Las sustancias que contienen cannabinoides sintéticos (SCB) también se conocen con la marca "Spice", "K2", "herbal incense", "Cloud 9", "Mojo".

Tabla 1: Ejemplos de cannabinoides sintéticos

Clase	Cannabinoides sintéticos	
	THC	HU-210
Dibenzopiranos (cannabinoides clásicos)		
Naftolindoles	JWH-018 	JWH-073  AM-2201 
Ciclohexilfenoles	CP-47497 	CP-55940 
Fenilacetilindoles	JWH-250 	RCS-4 
Tetrametilciclopropanolindoles	XLR-11 	
Indazol-3-carboxamidas	AB-CHMINACA 	AB-FUBINACA 
Aminoatquilindoles	WIN 55,212-2 	

Por lo tanto, y como se utiliza en el presente documento, los trastornos relacionados con los cannabinoides incluyen trastornos asociados al consumo de cannabinoides.

Las expresiones "3 β -(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona" o "C₂₉H₄₀O₃" o "3 β -(*para*-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona" o "3pMBP" o "1-((3S,8S,9S,10R,13S,14S,17S)-3-((4-metoxibencil)oxi)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)etan-1-ona" designan el derivado de pregnenolona de acuerdo con la presente invención que tiene la siguiente fórmula (I):



Fórmula (I)

El término "tratamiento" o la expresión "método de tratamiento" o su equivalente no pretende ser un término absoluto y, cuando se aplica a, por ejemplo, trastornos relacionados con los cannabinoides se refiere a un procedimiento o curso de acción diseñado para reducir, eliminar o aliviar uno o más síntomas de los trastornos relacionados con los cannabinoides.

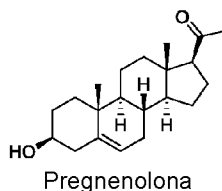
A menudo, se realizará un "tratamiento" o un "método de tratamiento" de los trastornos relacionados con los cannabinoides incluso con una baja probabilidad de éxito, pero, no obstante, se considerará que induce un efecto beneficioso general. El tratamiento de los trastornos relacionados con los cannabinoides se refiere, por ejemplo, al retraso del inicio, la reducción de la frecuencia de uno o más síntomas, o la reducción de la gravedad de uno o más síntomas asociados con el trastorno. En algunas circunstancias, la frecuencia y gravedad de uno o más síntomas se reduce a niveles no patológicos.

Más particularmente, el término "tratamiento" o la expresión "método de tratamiento" de los trastornos relacionados con los cannabinoides se refiere a una mejora de los criterios clínicos conductuales o biológicos en el sujeto. Por ejemplo, "tratamiento" o un "método de tratamiento" de los trastornos por consumo de cannabinoides puede referirse en particular a una disminución en el número y/o la intensidad de los criterios 1 a 11 como se define anteriormente para los trastornos por consumo de cannabinoides. También puede referirse a la prevención o retraso de la aparición o reducción de la intensidad de criterios clínicos conductuales o biológicos asociados a otros trastornos relacionados con los cannabinoides.

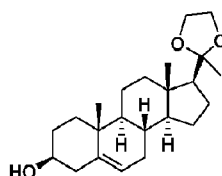
De acuerdo con este aspecto que no forma parte de la invención, se divulga en el presente documento un proceso para la fabricación del compuesto de Fórmula (I), que comprende tres fases químicas a partir de pregnenolona como material de partida fácilmente disponible.

Dicho proceso para la fabricación del compuesto de Fórmula (I) comprende:

- Una primera etapa de protección de la pregnenolona:

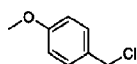


dentro de un compuesto de Fórmula (IV):



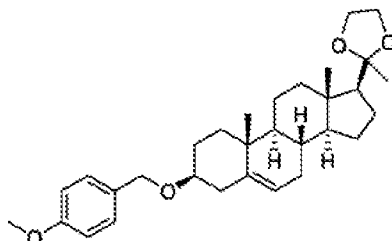
Fórmula (IV)

- Una segunda etapa en donde dicho compuesto de Fórmula (IV) reacciona con un compuesto de Fórmula (III):



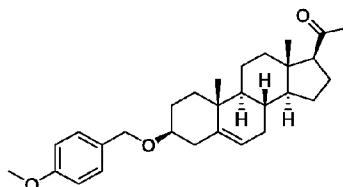
Fórmula (III)

5 para obtener un compuesto de Fórmula (II):



Fórmula (II)

10 - Una tercera etapa en donde se desprotege el compuesto de Fórmula (II) para obtener el compuesto de Fórmula (I):



Fórmula (I)

15 El proceso para la fabricación del compuesto de Fórmula (I) se describe en la Figura 1.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (II):



Fórmula (I)

25 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La forma de la composición farmacéutica, la vía de administración, la dosis y el régimen naturalmente dependerán de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

30 Si bien es posible que el compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible formularlo en una composición farmacéutica de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional. Por tanto, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) en mezcla con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 La presente invención proporciona además un proceso para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo dicho proceso mezclar un compuesto de Fórmula (I), junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica normalmente comprenderá al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes aceptables para uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 21ª Edición 2011. La elección del excipiente farmacéutico puede

seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y a la práctica farmacéutica convencional. El excipiente debe ser aceptable en el sentido de que no sea perjudicial para el destinatario del mismo. El al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, un aglutinante, un diluyente, un vehículo, un lubricante, un disgregante, un agente humectante, un agente dispersante, un agente de suspensión y similares.

Las vías de administración (suministro) del compuesto definido anteriormente incluyen, pero sin limitación: oral (por ejemplo, en forma de comprimido, cápsula o como una solución ingerible), tópica, mucosa (por ejemplo, como aerosol nasal o aerosol para inhalación), nasal, gastrointestinal, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intraocular, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), transdérmica, rectal, bucal, epidural, sublingual.

Las vías de administración preferidas incluyen oral, mucosa, parenteral y sublingual.

Por ejemplo, el compuesto se puede administrar por vía oral en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos, píldoras, cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, polvos orales, gránulos, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

Los comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, un disgregante tal como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato de sodio, croscarmelosa sódica y determinados silicatos complejos, un aglutinante tal como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga, un lubricante tal como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como materiales de relleno en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón de patata, almidón de maíz, amilopectina, derivados de celulosa o gelatina. Las cápsulas de gelatina dura pueden contener granulados del compuesto de la invención.

Las cápsulas de gelatina blanda se pueden preparar con cápsulas que contienen el compuesto de la invención, aceite vegetal, ceras, grasa u otro vehículo adecuado para cápsulas de gelatina blanda. Como ejemplo, el vehículo aceptable puede ser un vehículo oleaginoso, tal como un aceite vegetal con triglicéridos de cadena larga (por ejemplo, aceite de maíz).

Los polvos y granulados dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua pueden contener el principio activo junto con agentes dispersantes, agentes humectantes y agentes de suspensión y uno o más conservantes. Los excipientes adicionales, por ejemplo, edulcorantes, agentes aromatizantes y colorantes, también pueden estar presentes. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante, tal como ácido ascórbico. Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral pueden incluir soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como agua o un vehículo oleaginoso. La forma farmacéutica líquida se puede presentar en forma de un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes complejantes tales como 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, sulfobutiléter-beta-ciclodextrina y agentes edulcorantes, saborizantes, perfumantes, colorantes o tintes con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos. Estas composiciones pueden preservarse mediante la adición de un antioxidante, tal como hidroxianisol butilado o alfa-tocoferol.

El polvo finamente dividido del compuesto de la invención se puede preparar, por ejemplo, mediante micronización o mediante procesos conocidos en la técnica. El compuesto de la invención se puede moler usando procedimientos de molienda conocidos tales como molienda en húmedo para obtener un tamaño de partícula apropiado para la formación de comprimidos y para otros tipos de formulación.

Si el compuesto de la presente invención se administra por vía parenteral, entonces los ejemplos de dicha administración incluyen uno o más de: administración del agente por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea; y/o mediante el uso de técnicas de infusión.

El compuesto de la invención se puede administrar por vía parenteral con una formulación inmediatamente disponible o de depósito.

Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral de una formulación inmediatamente disponible pueden estar en forma de una solución o suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, de dispersión estabilizadores, humectantes y/o complejantes tales como ciclodextrina, por ejemplo, 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, sulfobutiléter-beta-ciclodextrina.

La formulación de depósito para la administración parenteral se puede preparar mediante técnicas convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen, sin limitación, polímeros biocompatibles y biodegradables (por ejemplo, poli(β -caprolactona), poli(óxido de etileno), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico)-co-(ácido glicólico)...), poli(ácido láctico)...), polímeros no biodegradables (por ejemplo, copolímero de etileno y acetato de vinilo, poliuretano, poliéster(amida), cloruro de polivinilo...) vehículos acuosos y no acuosos (por ejemplo, agua, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de soja, aceite de ricino, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados, propilenglicol, DMSO, THF, 2-pirrolidona, N-metilpirrolidinona, N-vinilpirrolidinona...).

Alternativamente, el principio activo puede estar en forma seca, tal como un sólido en polvo, cristalino o liofilizado para su constitución con un vehículo adecuado. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se realiza fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

Como se ha indicado, el compuesto de la presente invención se puede administrar por vía intranasal o por inhalación y se administra convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación en aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, (por ejemplo, de Ineos Fluor), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, la bomba, el pulverizador o el nebulizador puede contener una solución o suspensión del compuesto activo. Las cápsulas y los cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. Para composiciones adecuadas y/o adaptadas para la administración inhalada, se prefiere que el compuesto o sal de fórmula (I) esté en una forma de reducido tamaño de partícula y, más preferentemente, la forma de reducido tamaño se obtiene o se puede obtener mediante micronización. El tamaño de partícula preferible del compuesto o sal o solvato de tamaño reducido (por ejemplo, micronizado) se define por un valor de D_{50} de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 micras (por ejemplo, medido usando difracción láser). Alternativamente, el compuesto de la presente invención se puede administrar en forma de supositorio o pesario, o se puede aplicar tópicamente en forma de gel, hidrogel, loción, solución, crema, ungüento o polvo para espolvorear. El compuesto de la presente invención también puede administrarse por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo. También puede administrarse por vía pulmonar o rectal. También puede administrarse por vía ocular. Para uso oftálmico, el compuesto puede formularse como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica, pH ajustado, o, preferentemente, como soluciones en solución salina estéril isotónica, pH ajustado, opcionalmente junto con un conservante tal como cloruro de benzalconio. Alternativamente, puede formularse en un ungüento tal como vaselina.

Para la aplicación tópica a la piel, el agente de la presente invención puede formularse como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, puede formularse como una loción o crema adecuada, suspenderse o disolverse en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Normalmente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual. El nivel específico de dosis y la frecuencia de dosificación para un individuo particular puede variar y dependerá de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado y la longitud de acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y la gravedad de la afección particular y el individuo que se somete a terapia. El compuesto definido anteriormente se puede administrar a un sujeto para su uso en el tratamiento de trastornos relacionados con los cannabinoides en cualquier dosis adecuada para obtener un efecto terapéutico.

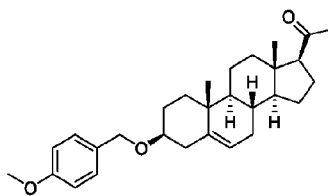
Para la administración oral y parenteral a seres humanos, el nivel de dosis diaria del agente puede ser en dosis únicas o divididas.

Un intervalo de dosis propuesto del compuesto de acuerdo con la presente invención para la administración a un ser humano (de aproximadamente 70 kg de peso corporal) es, incluyendo, aunque no de forma limitativa, de 1 μ g a 1.000 mg, más normalmente de 1 μ g a 500 mg, más normalmente de 1 μ g a 100 mg, más normalmente de 1 μ g a 50 mg, más normalmente de 1 μ g a 10 mg, más normalmente de 1 μ g a 5 mg, más normalmente de 1 μ g a 1 mg, más normalmente de 1 μ g a 600 μ g, más normalmente de 1 μ g a 200 μ g, más normalmente de 1 μ g a 100 μ g, más normalmente de 1 μ g a 60 μ g, más normalmente de 10 μ g a 1.000 mg, más normalmente 10 μ g a 500 mg, más normalmente de 10 μ g a 100 mg, más normalmente de 10 μ g a 50 mg, más normalmente de 10 μ g a 10 mg, más normalmente de 10 μ g a 5 mg, más normalmente de 10 μ g a 1 mg, más normalmente de 10 μ g a 600 μ g, más normalmente 10 μ g a 200 μ g, más normalmente 10 μ g a 100 μ g, más normalmente 20 μ g a 1.000 mg, más normalmente 20 μ g a 600 mg, más normalmente de 20 μ g a 200 mg, más normalmente de 20 μ g a 60 mg, más normalmente de 20 μ g a 20 mg, más normalmente de 20 μ g a 6 mg, más normalmente de 20 μ g a 2 mg, más

normalmente de 20 µg a 600 µg, más normalmente 20 µg a 200 µg del principio activo por dosis unitaria, expresado como el peso de ácido libre. La dosis unitaria puede administrarse, por ejemplo, de 1 a 4 veces al día. La dosis dependerá de la vía de administración. Se apreciará que puede ser necesario realizar variaciones rutinarias en la dosis dependiendo de la edad y el peso del paciente, así como de la gravedad de la afección a tratar. La dosis también dependerá de la vía de administración. La dosis precisa y la vía de administración quedarán, en última instancia, a criterio del médico o veterinario tratante.

Una "dosis adecuada", una "cantidad eficaz" del compuesto de la invención se refiere a la cantidad eficaz suficiente para impedir, reducir, eliminar, controlar, tratar o inhibir un trastorno relacionado con los cannabinoides. El término "controlar" pretende referirse a todos los procesos en donde puede haber una desaceleración, interrupción, detención o parada de la progresión de las enfermedades y afecciones descritas en el presente documento, pero no necesariamente indica una eliminación total de todos los síntomas de enfermedad y afección. La dosis utilizada para la administración se puede adaptar en función de diversos parámetros, en particular, en función del modo de administración utilizado, de la patología pertinente o, como alternativa, de la duración deseada del tratamiento. Naturalmente, la forma de la composición farmacéutica, la vía de administración, la dosis y el régimen naturalmente dependen de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del sujeto, etc. No se pretende que los intervalos de dosis eficaces proporcionados a continuación limiten la invención y representan intervalos de dosis preferidos. No obstante, la dosis preferida se puede adaptar al sujeto individual, como se entiende y se puede determinar por un experto en la técnica, sin excesiva experimentación.

De acuerdo con un aspecto que no forma parte de la presente invención, en el presente documento se divulga el uso del compuesto de Fórmula (I):



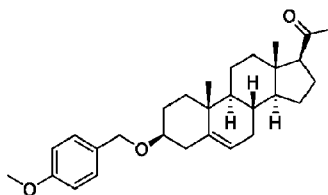
Fórmula (I)

para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno relacionado con los cannabinoides.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis, preparación y formulación de 3pMBP

3β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona (3pMBP) es una entidad química que contiene 7 centros quirales 3S, 8S, 9S, 10R, 13S, 14S, 17S como se describe en la Fórmula (I):



Fórmula (I)

La configuración estereoquímica en estos centros es idéntica a la del material de partida pregnenolona.

Preparación de 3β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona (3pMBP)

La preparación de 3pMBP se describe en la figura 1 y a continuación

• Fase 1: Preparación del compuesto de Fórmula (IV): (3S, 8S, 9S, 10R, 13S, 14S, 17S)-10,13-dimetil-17-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)-2,3,4,7, 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol

La Fase 1 se llevó a cabo en un solo lote. Se cargaron en un reactor etilenglicol (11,676 kg), pregnenolona (6,992 kg,) y ácido para-toluenosulfónico (0,840 kg, 4,42 moles, 0,2 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a una temperatura entre 15 °C y 25 °C durante 25 min. Se añadió ortoformiato de trietilo (20,939 kg) en tres porciones y la mezcla se

agitó durante al menos 1 hora a una temperatura entre 15 °C y 25 °C. Una vez completado, la mezcla de reacción se recogió y se vertió lentamente sobre una solución de bicarbonato de sodio (2,943 kg en 35,5 l de agua) entre 0 °C y 10 °C. Al final de la adición, la mezcla de reacción se agitó a 0 °C y 10 °C durante 1 h, a continuación, la mezcla de reacción se filtró y se lavó con agua (12 l). El filtrado también se lavó con 2-propanol (12 l) y se secó al vacío en un flujo de nitrógeno. El sólido seco se recogió y se cargó en un reactor con 2-propanol (35 l). La suspensión se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió entre 0 °C y 10 °C y luego se agitó durante 2 h. El sólido se filtró y se lavó con 2-propanol (12 l) y, a continuación, se secó al vacío bajo un flujo de nitrógeno. Se obtuvo el compuesto de Fórmula (IV) (8,031 kg) con un rendimiento del 100,8 % (rendimiento no corregido).

• Fase 2: Preparación del compuesto de Fórmula (II): 2-(3S, 8S, 9S, 10R, 13S, 14S, 17S)-3-(4-metoxibencil)oxi)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)-2-metil-1,3-dioxolano

Se cargaron en un reactor el compuesto de Fórmula (IV) (3,460 kg) y tetrahidrofurano (THF) (69 l). La mezcla de reacción se agitó a una temperatura entre 20 °C y 25 °C durante 80 minutos. La mezcla de reacción se filtró y la solución del compuesto de Fórmula (IV) en THF se cargó en un reactor. Se añadió en porciones t-BuOK (2,835 kg) a una solución del compuesto de Fórmula (IV) en THF a una temperatura entre 20 °C y 25 °C. Al final de la adición, se añadieron *para*-metoxibencilcloruro de Fórmula (III) (2,832 kg) y THF (4 l) a la mezcla de reacción mediante un embudo de adición. La mezcla de reacción se calentó entre 38 °C y 42 °C. Se cargó TBAI (1,555 kg) en porciones a la mezcla de reacción a una temperatura entre 38 °C y 42 °C. La mezcla de reacción se calentó entre 55 °C y 60 °C durante 16h30.

Una vez completado, la mezcla de reacción se concentró al vacío para destilar entre 34 l y 36 l de THF. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente.

Se cargó agua (52 l) en el reactor y, a continuación, se enfrió entre 0 °C y 10 °C. La mezcla de reacción se vertió sobre agua con cuidado mientras se mantenía la temperatura entre 0 °C y 10 °C. Al final de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 1h50 entre 0 °C y 10 °C. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con agua (13 l). El filtrado se lavó con acetonitrilo (13,5 l) y el sólido se secó al vacío en un flujo de nitrógeno durante 4 días.

El sólido se recogió y se cargó en un reactor con acetonitrilo (13 l). La mezcla se calentó a reflujo durante 4 h. Se cargó además acetonitrilo (11 l) en el reactor y se calentó a reflujo hasta que se obtuvo una solución transparente. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 14 h. La mezcla de reacción se enfrió entre 0 °C y 10 °C, se agitó durante 45 minutos entre 0 °C y 10 °C y, a continuación, se filtró. Se cargó acetonitrilo (10,5 l) en el reactor, se enfrió entre 0 °C y 10 °C, a continuación, se añadió al filtro para lavar el filtrado y el sólido se secó al vacío en un flujo de nitrógeno durante 21 h. Se obtuvo el compuesto de Fórmula (II) (2,449 kg) con un rendimiento del 59,2 %.

• Fase 3: Preparación del compuesto de Fórmula (I): 3pMBP

Se cargaron en un reactor el compuesto de Fórmula (II) (2,448 kg) y diclorometano (10 l). La solución se agitó durante 20 minutos. Se añadió ácido clorhídrico 1 M (4,9 l) a la solución entre 15 °C y 25 °C. La mezcla de reacción se agitó hasta su finalización entre 15 °C y 25 °C. Se añadió diclorometano (8 l) (para disolver completamente cualquier precipitado) y se dejó que las fases se separaran. La capa orgánica se lavó con agua (5 l) dos veces. La capa orgánica se recogió y se cargó con 2-propanol (24,5 l) en el reactor entre 15 °C y 25 °C. La mezcla de reacción se concentró al vacío con una temperatura inferior a 40 °C. Una vez completado, la mezcla de reacción se calentó a reflujo. Se añadió 2-propanol (40 l) hasta que se observó una solución transparente. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió entre 0 °C y 10 °C, se agitó durante 1 h entre 0 °C y 10 °C. El sólido se filtró y se lavó con 2-propanol (5 l), a continuación, se secó al vacío equipado con un caudal de nitrógeno mientras se calentaba el filtro entre 35 °C y 45 °C durante 20 h. El compuesto de Fórmula (I) (1,907 kg) se obtuvo con un rendimiento del 85,8 %.

Composición farmacéutica

La 3β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona se puede formular como una forma farmacéutica en cápsula que contiene una solución de 3β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona en aceite de maíz. La composición de esta forma farmacéutica se describe en la tabla 2.

La presente invención proporciona un ejemplo para la preparación de cápsulas de gelatina blanda que contienen respectivamente solución de 20 µg, 0,2 mg y 2 mg de 3β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona en aceite de maíz.

Las etapas que componen el proceso de fabricación se pueden describir brevemente de la siguiente manera:

1. Se agitó 3β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona en aceite de maíz hasta su completa disolución.
2. A continuación, se rellenó una cápsula de gelatina blanda con solución de 3β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-

ona de la etapa 1 en una cápsula de gelatina blanda.

Todos los excipientes cumplen con monografías de la Farmacopea Europea vigente (Ph. Eur.) y monografías del Formulario Nacional de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP-NF).

Tabla 2: Composición de cápsulas de gelatina blanda de 3,β-(4-metoxibenciloxi)pregn-5-en-20-ona

	cápsula de 0,02 mg	cápsula de 0,20 mg	cápsula de 2,00 mg
3pMBP	0,020 mg	0,200 mg	2,000 mg
Aceite de maíz	96,980 mg	969,800 mg	969,000 mg
Dióxido de titanio	1,04 mg	5,29 mg	5,29 mg
Glicerol 85 %	21,61 mg	134,77 mg	134,77 mg
Gelatina,	47,79 mg	232,02 mg	232,02 mg
Peso total	167,44 mg	1342,08 mg	1342,08 mg

Ejemplo 2: Inhibición específica de la actividad del receptor CB1 por 3pMBP

- 10 La comprensión de los efectos del compuesto de la presente invención, 3pMBP, sobre la actividad del receptor CB1 se ha investigado estudiando los efectos de 3pMBP sobre los siguientes efectos celulares inducidos por la activación del receptor CB1 por el THC. La especificidad de los efectos de 3pMBP sobre el receptor CB1 se estudió analizando los efectos de este compuesto sobre la unión de otros 85 receptores.

15 **Materiales y métodos**

Efecto de 3pMBP sobre el aumento de la fosforilación de MAPK inducido por THC:

- 20 El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de 3pMBP sobre el aumento de la fosforilación de Erk1/2MAPK, comúnmente llamada MAPK (Proteína quinasas activadas por mitógenos), inducido por la administración de THC en células de riñón embrionario humano 293 (HEK-293) transfectadas de manera estable o transitoria con el receptor CB1 humano (hCB1).

- 25 Se eligieron las células HEK-293 porque no expresan receptores CB1 endógenos, se pueden transfectar fácilmente y se han utilizado previamente en experimentos que estudian la actividad *in vitro* del receptor CB1 (Shore *et al.*, 2014) y en experimentos que muestran que la pregnenolona es capaz de inhibir la fosforilación de MAPK inducida por THC (Vallée *et al.* 2014). El efecto de 3pMBP en tres dosis (1 nM, 10 nM y 100 nM, disuelta en acetonitrilo al 0,01 %) se probó sobre el efecto del THC a 1 µM (disuelto en EtOH al 6,2x10⁻⁴ %, Experimento 1) y 10 µM (disuelto en EtOH al 6,2x10⁻³ %, Experimento 2) sobre la fosforilación de MAPK. La diferencia en las concentraciones de THC utilizadas en los dos experimentos está relacionada con la diferente eficiencia de transfección del plásmido de ADNc de hCB1, que es estable en el Experimento 1 y transitorio en el Experimento 2. El tratamiento con THC y 3pMBP fue concomitante y duró 5 min.

- 35 La fosforilación de MAPK (proteínas P-Erk1/2MAPK) se midió mediante transferencia Western. En el experimento 1 se utilizaron como controles de carga el marcador mitocondrial CoxIV y en el experimento 2 las proteínas MAPK no fosforiladas. Se calcularon las proporciones P-MAPK/CoxIV y P-MAPK/MAPK y los datos se expresaron como % de células tratadas con vehículo.

Efecto de 3pMBP sobre la disminución del AMPc inducida por THC

- 40 El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de 3pMBP sobre la disminución del AMPc inducida por la administración de THC en células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan de forma estable el receptor CB1 humano CHO-hCB1.

- 45 En estos experimentos se eligieron células CHO-hCB1 porque no expresan endógenamente el receptor CB1 y se han utilizado previamente en experimentos que estudian los efectos de los agonistas de CB1 (Rinaldi-Carmona, 1996), incluido el THC, sobre cAMP y P-MAPK.

- 50 Los efectos de 3pMBP en cuatro dosis (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM, disuelta en N,N-dimetilformamida al 0,01 %) se probaron frente a una función de reacción a la dosis de THC (0,3 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM y 300 nM, disuelto en etanol 0,0063%). Se trataron células CHO-CB1-C2 añadiendo concomitantemente THC y el compuesto de prueba durante 45 minutos. También se añadió simultáneamente forskolina (2,5 µM) en todas las condiciones probadas para mantener el nivel basal de AMPc. Al final del tratamiento, las células se sometieron a lisis para proceder con la cuantificación de AMPc. Todas las medidas se realizaron por triplicado en un experimento.

- 55 La determinación cuantitativa de AMPc se realizó mediante un inmunoensayo de fluorescencia competitivo. Los datos se expresaron como % de delta fluorescencia (Delta F) que se calculó de la siguiente manera: Delta F % = (Fluorescencia de la muestra - Fluorescencia del control negativo) / Fluorescencia del control negativo.

Efecto de 3pMBP sobre la disminución de la respiración celular inducida por THC

El objetivo de este estudio era probar el efecto de 3pMBP sobre la inhibición de la respiración celular inducida por THC (1 μ M) en células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con los receptores CB1 humanos (hCB1).

Las células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con el plásmido que expresa hCB1 se trataron primero con 3pMBP (0, 1, 10 y 100 nM disuelta en acetonitrilo al 0,01%). Después de 15 min de incubación, se añadió THC (0, 1 μ M, disuelto en EtOH al 0,0034 %) en las placas de cultivo durante 30 minutos.

La respiración celular se midió en un oxímetro calibrado equipado con un electrodo de Clark. La tasa de consumo de oxígeno (CO) se utilizó para medir la respiración celular. Los efectos del THC, en ausencia y presencia de 3pMBP, sobre la tasa de CO se expresaron como porcentajes de la CO inicial de la célula tratada con el vehículo de 3pMBP y el vehículo de THC del mismo experimento. Se realizaron 10 experimentos independientes para obtener un n=10 por condición experimental. Cada experimento tenía un n=5 que contenía n=1 por grupo experimental.

Selectividad de unión de 3pMBP in vitro:

Esta serie de ensayos tenían como objetivo evaluar la especificidad de unión de 3pMBP comparándolo con el perfil de pregnenolona.

Se probó la capacidad potencial de 3pMBP y pregnenolona, a una concentración de 10 μ M, para desplazar la unión de ligandos de 85 receptores (Perfil de alto rendimiento de CEREP + 4 receptores de esteroides + receptor de cannabinoides tipo 2). El perfil de alto rendimiento de CEREP consiste en una amplia colección de 80 receptores transmembrana y solubles, canales iónicos y receptores acoplados a proteína G. Ha sido diseñado específicamente para proporcionar información para priorizar los compuestos más prometedores en el proceso de selección de cabeza de serie. Se añadieron a este ensayo los receptores de andrógeno, estrógeno, progesterona y PXR y, a continuación, el receptor cannabinoide tipo 2 para adaptar mejor el ensayo a 3pMBP completando el espectro de receptores de esteroides ya contenidos en el perfil de alto rendimiento de CEREP.

Resultados

3pMBP tiene un perfil similar a la pregnenolona eCB1-SSi. 3pMBP inhibe el aumento inducido por THC en la fosforilación de MAPK (FIGURA 2A y 2B) y la disminución inducida por THC en la respiración celular (CI_{50} = 1,2-11 nM) en células HEK-293 transfectadas de manera estable o transitoria con hCB1 (FIGURA 2D).

Por lo contrario, 3pMBP no inhibió la disminución de AMPc inducida por THC en células CHO que expresaban de manera estable el receptor CB1 humano CHO-hCB1 (FIGURA 2C).

Además, 3pMBP (10 μ M) no modificó la unión de ninguno de los 85 receptores que se probaron *in vitro* utilizando el perfil de alto rendimiento de CEREP, incluyendo los principales receptores de esteroides, los receptores PXR y los receptores CB1 y CB2. En este sentido 3pMBP fue más selectiva que la pregnenolona (10 μ M) que desplazó (>80 %) la unión de los receptores de glucocorticoide, andrógenos y progesterona y en menor medida (>40 %) la unión de los receptores de benzodiazepinas centrales y periféricos.

Los efectos de 3pMBP se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3: Evaluación in vitro del mecanismo de acción de 3pMBP

Efectos de 3pMBP sobre:	Sistema de prueba	DI50	DI100	% de inhibición
Aumento de la fosforilación de MAPK inducido por THC en células que expresan de manera estable el hCB1	HEK-293	1,2 nM	10 nM	60
Aumento de la fosforilación de MAPK inducido por THC en células que expresan de manera transitoria hCB1	HEK-293	11 nM	100 nM	100
Disminución del AMPc inducida por THC	CHO	>1 μ M	—	NA
Disminución de la respiración celular inducida por THC	HEK-293	8 nM	100 nM	57
Perfil de unión de alto rendimiento de CEREP (85 receptores)	Unión al receptor	>10 μ M	—	NA
NA = No analizado porque no se encontró ningún efecto				

Conclusión

Por lo tanto, 3pMBP *in vitro* actúa como inhibidor específico de la señalización del CB1 (CBI-SSi). Por tanto, 3pMBP, en líneas celulares que expresan el receptor CB1 humano (hCB1) inhibió el aumento de la fosforilación de MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) inducido por THC y las disminuciones de la respiración celular inducidas

por THC. Por el contrario, 3pMBP no inhibió las disminuciones de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) inducidas por THC.

Asimismo, 3pMBP *in vitro* es más selectivo que el inhibidor endógeno específico de señalización pregnenolona. Efectivamente, la pregnenolona (10 μ M) desplaza la unión (>80 %) de los receptores de progesterona, glucocorticoides y andrógenos, así como la unión de los receptores de benzodiazepinas (>40%). 3pMBP (10 μ M) no modificó la unión de estos receptores ni de ninguno de los otros receptores (85 en total) que se estudiaron utilizando el perfil de alto rendimiento de CEREP.

Ejemplo 3: Evaluación preclínica de 3pMBP como tratamiento de los trastornos relacionados con los cannabinoides

En los siguientes estudios preclínicos, 3pMBP se ha solubilizado en aceite de maíz, un aceite vegetal con triglicéridos de cadena larga que puede usarse de forma segura en seres humanos. Esta formulación lipídica se ha administrado *per os* mediante gavage como un líquido.

La activación del receptor CB1 puede producir trastornos relacionados con los cannabinoides y sus consecuencias adversas asociadas mediante dos efectos complementarios:

1. Los efectos farmacodinámicos incondicionados de los cannabinoides que incluyen profundos deterioros cognitivos, motivacionales y conductuales. Estos tres efectos pueden producir sinérgicamente consecuencias graves para diferentes tipos de trastornos relacionados con los cannabinoides. Son especialmente responsables de: a. Relaciones sociales deterioradas y menor satisfacción con la vida; b. Peores resultados educativos, bajos ingresos, mayor dependencia de prestaciones sociales y desempleo, en particular, para la población más vulnerable (14-25 años); c. Trastornos psiquiátricos que incluyen, aunque no de forma limitativa, depresión, ansiedad y psicosis; y d. Resistencia a participar en tratamientos psicológicos;
2. Los efectos condicionados de los cannabinoides que conducen al desarrollo de búsqueda de cannabinoides, consumo regular y, en última instancia, a la dependencia de los cannabinoides. La capacidad de los cannabinoides para condicionar el comportamiento, lo que conduce a la adicción a los cannabinoides, dificulta la interrupción del consumo de cannabinoides y facilita la recaída después de un período de abstinencia, dando como resultado una exposición continua a los efectos adversos de los cannabinoides.

Basándose en las observaciones anteriores, un tratamiento farmacológico ideal para los trastornos relacionados con los cannabinoides debería poder:

1. Antagonizar un amplio espectro de efectos incondicionados de los cannabinoides, para reducir el impacto negativo del consumo de cannabinoides en el funcionamiento del cerebro y el comportamiento.
2. Facilitar la reducción del consumo de cannabinoides y disminuir la recaída en el consumo de cannabinoides después de la interrupción, con el fin de disminuir la exposición del cerebro a los cannabinoides y sus consecuencias negativas.

Estos dos efectos combinados, que crean un circuito de retroalimentación positivo (disminución de los efectos de los cannabinoides y disminución de la cantidad de cannabinoides tomados), debería proporcionar una herramienta poderosa para tratar los diferentes trastornos relacionados con los cannabinoides.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la evaluación preclínica del potencial de 3pMBP como tratamiento de los trastornos relacionados con los cannabinoides se realizó mediante el estudio de:

1. Varios modelos de comportamiento que reproducen los efectos incondicionados de los agonistas de CB1 en consumidores de cannabinoides. Para estos estudios se utilizó el principio activo del cannabis, THC, debido a que es el cannabinoide más utilizado en seres humanos.
2. Varios modelos de comportamiento (en ratones y primates no humanos) que evalúan la capacidad del THC y los cannabinoides sintéticos para condicionar el comportamiento e inducir dependencia.

1. Inhibición por 3pMBP de los efectos incondicionados del THC

Se estudió la inhibición por la administración oral de 3pMBP de los efectos conductuales y neuroquímicos incondicionados del THC que se describen a continuación relacionados con los trastornos relacionados con los cannabinoides:

- a. Aumento de la ingesta de alimentos inducido por THC;
- b. Aumento de la estimulación psicomotora inducido por THC;
- c. Deterioro de la inhibición prepulso inducido por THC;
- d. Deterioros de la memoria inducidos por THC;
- e. Deterioro de la interacción social inducido por THC;
- f. Deterioro de las pruebas de realidad inducido por THC;

- g. Catalepsia inducida por THC;
- h. Comportamiento de abertura de boca inducido por THC;
- i. Liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducida por THC.

5 a. Aumento de la ingesta de alimentos inducido por THC

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar la capacidad de 3pMBP para inhibir el aumento de la ingesta de alimentos inducido por la administración de THC en ratones. Se eligió este comportamiento porque en los consumidores de cannabis hay una alteración de la conducta alimentaria con propensión a la hiperfagia y preferencia por alimentos sabrosos justo después del consumo de drogas (Kirkham, 2005).

15 Materiales y métodos

Los efectos del THC sobre la ingesta de alimentos se estudiaron mediante el modelo de ayuno-realimentación (Bellocchio *et al.*, 2010) en ratones macho CB1^{trf}. Se probó el efecto de 3pMBP en tres dosis (5, 15 y 50 µg/kg) sobre el aumento de la ingesta de alimentos inducido por THC (1 mg/kg; ip) en ratones privados de alimento durante 24 horas y que fueron realimentados 30 minutos después del THC. Se midió la ingesta de alimentos durante una hora. Se utilizaron grupos independientes de animales (al menos n=8 por grupo) para cada condición de tratamiento. Se administró 3pMBP tres horas antes de la administración de THC.

20 Resultados

Como se describe en la Figura 3A, 3pMBP inhibe (DI₅₀ ≈15 y DI₁₀₀ ≈50 µg/kg) el aumento de la ingesta de alimentos inducido por THC (1 mg/kg) en ratones.

25 b. Aumento de la estimulación psicomotora inducido por THC

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar la capacidad de 3pMBP para inhibir el aumento de la estimulación psicomotora inducido por la administración de THC en ratones. Se eligió este comportamiento porque se considera un sustituto de síntomas tipo psicóticos que pueden desencadenarse por el consumo de cannabis (Wiley *et al.*, 2008; DSM 5TM ed., 2013).

30 Materiales y métodos

La estimulación psicomotora inducida por THC se estudió en ratones macho C57BL/6N midiendo la actividad locomotora en un campo abierto con un suelo con un patrón de cuadrados. La locomoción se evaluó 45 minutos después del THC durante 5 minutos contando el número de cuadrados cruzados y expresado como porcentaje de los controles tratados con el vehículo.

Se probó el efecto de 3pMBP en cinco dosis (0,00015, 0,0005, 0,0015, 0,015 y 0,15 mg/kg) sobre el aumento de la actividad locomotora inducido por THC (0,3 mg/kg). Se utilizaron grupos independientes de animales (al menos n = 9 por grupo) para cada dosis de 3pMBP. Se administró 3pMBP tres horas antes de la administración de THC.

40 Resultados

3pMBP inhibe (DI₅₀ ≈0,0004 y DI₁₀₀ ≈0,0015 mg/kg) la estimulación psicomotora inducida por THC (0,3 mg/kg) en ratones (Figura 3B).

50 c. Deterioro de la inhibición prepulso inducido por THC

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar la capacidad de 3pMBP para inhibir el deterioro de la estimulación sensorial inducido por la administración de THC en ratones según lo estudiado mediante la prueba de inhibición prepulso (IPP). Se eligió este comportamiento porque es un modelo del deterioro de la estimulación sensorial-motora observado en la psicosis (DSM 5TM ed., 2013; Kedzior *et al.* 2006) que se ha demostrado que es inducido por el THC (Nagai, 2006).

55 Materiales y métodos

Se probó el efecto de 3pMBP en cinco dosis (0,0005, 0,0015, 0,015, 0,03 y 0,05 mg/kg) sobre el deterioro de IPP inducido por THC (10 mg/kg) en ratones macho C57BL/6N. Se administró 3pMBP tres horas antes de la administración de THC.

La IPP se midió utilizando jaulas de IPP automatizadas que permitieron el suministro automático del protocolo de IPP y el registro de las reacciones de sobresalto del animal. Cada ratón (al menos n = 8 por grupo) se sometió a la prueba de IPP 60 minutos después del THC durante 45 minutos.

El ensayo de IPP incluyó diferentes tipos de ensayos consistentes en la presentación ya sea del ruido de fondo, el estímulo de sobresalto (S; 120 dB) solo, uno de los estímulos prepulso (73 dB, 76 dB u 82 dB) solo o una combinación de uno de cada estímulo prepulso seguido del estímulo de sobresalto (IPP-S). Se registró la respuesta de sobresalto después de la presentación del pulso y se calculó un índice de IPP ($\% \text{ IPP} = 100 \times (\text{S} - \text{IPP-S})/\text{S}$).

Resultados

3pMBP inhibe ($\text{DI}_{50} \approx 0,005$ e $\text{DI}_{100} \approx 0,015$ mg/kg) el deterioro de la inhibición prepulso inducido por THC (10 mg/kg) en ratones. La Figura 3C muestra el efecto de 3pMBP con un prepulso de 82dB.

d. Efectos de 3pMBP sobre los deterioros de memoria inducidos por THC

En estos experimentos, se estudiaron los efectos de 3pMBP sobre el deterioro inducido por THC en dos pruebas de memoria: a. memoria de trabajo y b. memoria a largo plazo. La memoria de trabajo es la capacidad de almacenar y procesar información temporalmente. Se requiere para llevar a cabo actividades de la vida cotidiana tales como mantener una conversación, un razonamiento, comprensión lectora. El déficit de memoria de trabajo es uno de los síntomas cognitivos centrales en la psicosis que no mejora con los antipsicóticos actuales (Pratt *et al.*, 2012). El deterioro de la memoria de trabajo también es una consecuencia típica de la administración aguda de THC tanto en seres humanos como en animales (D'Souza, 2007). La memoria a largo plazo es la capacidad de almacenar información aprendida en un compartimento de la memoria estable que permita recordarla mucho tiempo después de que se haya producido el aprendizaje. El deterioro de la memoria a largo plazo también es un efecto típico de la administración de THC.

Material y métodos

Deterioro de la memoria de trabajo inducido por THC

En ratones, la memoria de trabajo se puede evaluar en la versión emparejamiento demorado del laberinto acuático de Morris, una tarea de memoria espacial en la que los animales necesitan procesar información nueva y previamente adquirida para encontrar la ubicación de una plataforma de escape oculta.

En ratones, la administración aguda de THC (5 mg/kg) deteriora la memoria de trabajo en esta tarea (Busquets-García *et al.*, 2017).

El aparato consistía en una piscina circular blanca (150 cm de diámetro y 60 cm de alto) colocada en el medio de la sala experimental con una intensidad de luz de 90 a 100 lux. La piscina se llenó con agua (19-21 °C) que se volvió opaca usando una pintura cosmética blanca, inodora y no tóxica. Una plataforma blanca de 14 cm de diámetro estaba escondida 1 cm por debajo de la superficie del agua. Esta prueba de conducta consistió en tres fases: adaptación, entrenamiento y prueba. Durante la fase de adaptación, los animales se colocaron una vez en la piscina durante 90 segundos y, a continuación, se dejaron en la plataforma durante 30 segundos para acostumbrarse a las condiciones experimentales y disminuir su estrés durante el entrenamiento y la prueba. Una vez adaptado, los ratones se sometieron al entrenamiento. Imágenes de diferentes formas colocadas en las paredes de la habitación sirvieron como señales espaciales. Cada sesión de entrenamiento (una por día) consistió en cuatro ensayos. En cada ensayo se colocó al ratón en el agua, de cara a la pared de la piscina y, a continuación, se dejó que nadara hasta llegar a la plataforma oculta. Si el ratón no llegaba a la plataforma en 90 segundos, era guiado hacia la misma. A continuación, el ratón permaneció en la plataforma durante 30 segundos (intervalo entre ensayos). Los lugares de inicio fueron los mismos para el primer y cuarto ensayo, pero diferentes para los demás. La posición de la plataforma se cambiaba todos los días para que en el primer ensayo de cada sesión el ratón siempre lo encontrara por casualidad. Las sesiones de entrenamiento se repitieron hasta que los ratones realizaban una disminución significativa en la latencia para alcanzar la plataforma entre el primer ensayo y cada uno de los 3 ensayos siguientes durante tres días consecutivos. El entrenamiento duró de 8 a 12 días. Después del entrenamiento, los ratones recibieron los tratamientos farmacológicos y, a continuación, realizaron una única sesión de ensayo utilizando el mismo protocolo que las sesiones de entrenamiento (es decir, 4 ensayos, intervalos entre ensayos de 30 segundos, límite a los 90 segundos). El rendimiento de la memoria de trabajo en la sesión de ensayo se midió calculando el índice de ahorro de tiempo utilizando la siguiente fórmula: $\text{Índice de ahorro} = (\text{ensayo de latencia de escape 1} - \text{ensayo de latencia de escape 4}) / (\text{ensayo de latencia de escape 1} + \text{ensayo de latencia de escape 4})$.

A los ratones se les administró THC (5 mg/kg, ip) o su vehículo 30 minutos antes de la sesión de prueba. Se administró 3pMBP (0,015; 0,15 o 0,45 mg/kg, *per os* por gavaje oral) o su vehículo 3 horas antes de la administración de THC o su vehículo.

Deterioro de la memoria a largo plazo inducido por THC.

En ratones, la memoria a largo plazo se puede evaluar mediante la prueba de reconocimiento de objetos en la que se evalúa el recuerdo de un objeto específico 24 horas después. Para este experimento específico, los ratones macho CD1-SWISS recibieron una administración aguda *per os* de 3pMBP (0,005 mg/kg) o vehículo de aceite de maíz (5

ml/kg), seguido 3 horas después de una inyección intraperitoneal (ip) de THC (6 mg/kg; 10 ml/kg). Diez minutos antes de la inyección de THC, a los ratones se les permitió explorar 2 objetos idénticos en un laberinto en forma de "L". El día después, un objeto fue reemplazado por uno novedoso. De acuerdo con la preferencia espontánea por la novedad, los ratones exploran durante más tiempo los objetos novedosos (Ennaceur, 2010). La comparación del tiempo dedicado a explorar los objetos familiares y nuevos se utiliza como índice de discriminación entre familiaridad y novedad. Por lo tanto, este parámetro se utiliza para evaluar el rendimiento del reconocimiento de objetos.

Resultados

3pMBP inhibe completamente el deterioro del reconocimiento de objetos inducido por THC (Figura 4B) a 0,005 mg/kg con una DI_{50} que era $<0,005$ mg/kg. De forma similar, 3pMBP administrada a 0,015; 0,15 o 0,45 mg/kg bloquea de forma dependiente de la dosis el deterioro del rendimiento de la memoria de trabajo inducido por THC (5 mg/kg) con una DI_{100} de 0,15 mg/kg (Figura 4A).

e. Efectos de 3pMBP sobre el deterioro de la interacción social inducido por THC

El retraimiento social en la psicosis se define como la indiferencia o falta de deseo de tener interacción social (Wilson y Koenig, 2014). La interacción social se puede evaluar en ratones midiendo su preferencia espontánea por el encuentro con un congénere en comparación con el no encuentro social. En este paradigma, la administración aguda de THC (3 mg/kg) reduce la preferencia social (Busquets-García *et al.*, 2017; Figura 4C), proporcionando un modelo confiable del endofenotipo de retraimiento social en la psicosis.

Material y métodos

Los ratones se probaron en un campo abierto (35 × 35 cm) con dos recipientes de plástico (cilindros de plástico de 8 cm de diámetro con orificios para la interacción de olores) colocados en dos esquinas opuestas, uno de ellos albergaba un ratón (macho adulto C57BL/6-N de 8 a 10 semanas de edad), mientras que el otro recipiente permanecía vacío. En cada esquina se definieron las zonas "social" y "no social" como un área de 8 cm que rodea los recipientes. Para cada grupo experimental, se contrarrestó la posición del recipiente con el ratón. El ratón experimental se colocó en el centro del campo abierto para explorar durante 5 minutos, filmado por una cámara. El tiempo transcurrido en ambas zonas se contabilizó considerando que el animal está en una zona cuando sus cuatro patas están dentro de las líneas dibujadas. El índice social se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Índice social} = \text{Tiempo de permanencia en la "zona social"} / \text{Tiempo total de permanencia en ambas zonas}.$$

A los ratones se les administró THC (3 mg/kg, ip) o su vehículo 2 horas antes de entrar al campo abierto. Se administró 3pMBP (0,005; 0,015; 0,05 mg/kg, *per os* en aceite de maíz) o su vehículo 3 horas antes que THC o su vehículo.

Resultados

3pMBP administrada a 0,005; 0,015 o 0,05 mg/kg, bloquea de forma dependiente de la dosis la reducción de la interacción social inducida por THC con una DI_{100} a 0,015 mg/kg (Figura 4C).

f. Deterioro de la prueba de realidad inducido por THC

Las alteraciones en la representación mental de los estímulos que conducen a desajustes entre las percepciones y la realidad son características clave de los síntomas positivos de los estados psicóticos (Busquets-García *et al.*, 2017). En roedores, la tarea de "prueba de la realidad" evalúa el posible desajuste entre la representación interna de un estímulo (olor o sabor) y la realidad que predicen.

Esta prueba se basa en el paradigma de aversión condicionada. Dos estímulos de igual valencia, normalmente un sabor y un olor, se presentan primero simultáneamente de manera repetida (6 veces). A continuación, uno de los estímulos, por ejemplo, el olor, se asocia con un acontecimiento nocivo (es decir, malestar gástrico inducido por LiCl). Tras el condicionamiento, los ratones muestran una aversión específica por el estímulo asociado al acontecimiento nocivo (es decir, el olor), pero no por el estímulo neutro (es decir, el sabor), aunque el olor y el sabor se presentaron previamente juntos. Estas respuestas sugieren que los ratones construyeron representaciones específicas de cada uno de los estímulos. No obstante, fármacos psicógenos que incluyen MK-801, anfetamina y THC provocan aversión a ambos estímulos, incluido el que no estaba condicionado por el acontecimiento nocivo (aversión mediada). Este efecto sugiere que los psicótrópos inducen una representación inexacta del estímulo "neutro". Estas alteraciones se revierten con el antipsicótico atípico risperidona (Busquets-García *et al.*, 2017). Por lo tanto, el deterioro de la "prueba de la realidad" inducido por THC y otros psicótrópos en ratones muestra validez aparente y predictiva para la investigación de síntomas psicóticos positivos.

Material y métodos.

La prueba de la realidad consiste en cuatro fases con diferentes emparejamientos (un emparejamiento se refiere a la

asociación de dos estímulos a la vez): adaptación (3 días), preconditionamiento (6 pares olor/sabor, 12 días), condicionamiento (es decir, 3 pares olor/inyección de un agente que induce malestar, LiCl, 6 días), día de recuperación (1 día con agua) y finalmente las pruebas (pruebas de aversión mediada y de aversión directa).

- 5 Los ratones se sometieron a restricción hídrica durante 24 horas antes de iniciar la adaptación que consistió en acceso a agua 1 hora por día durante 3 días para acostumbrarse a recibir líquido todos los días durante 1 hora, y así alcanzar un consumo constante a lo largo del protocolo. A esto le siguió la fase de preconditionamiento en la que los ratones tenían acceso durante 1 hora por día a una solución mixta (O1T1) con un olor (almendra o plátano, O1) y un sabor (maltodextrina o sacarosa, T1) en agua. El día 2, los ratones recibieron acceso durante 1 hora a la solución con el olor y sabor que no se les había dado el día anterior (O2T2). Después de 6 emparejamientos de O1T1 y O2T2 (12 días), se inició la fase de condicionamiento.

- 15 En el primer día de condicionamiento, a los ratones se les dio acceso durante 1 hora a agua olORIZADA (O1) seguido directamente de una inyección intraperitoneal de solución salina. Al día siguiente, a los ratones se les dio acceso a la segunda agua olORIZADA (O2) seguido directamente de una inyección intraperitoneal de LiCl (0,3 M) a un volumen de 10 ml/kg para crear malestar gástrico. Después de 3 emparejamientos de O1/solución salina y O2/LiCl (6 días), a los ratones se les dio un día de recuperación con 1 hora de acceso al agua.

- 20 El siguiente día, la aversión mediada se evaluó realizando una prueba de dos opciones con dos botellas de agua que contenían uno de los dos sabores: el sabor combinado con el olor asociado con la inyección de LiCl (T2) denominado C+; o el sabor combinado con el otro olor asociado con la inyección de solución salina (T1) denominado C-. En esta prueba, la aparición de aversión mediada se señala por una disminución en el consumo de agua que contiene el sabor asociado con el olor que se había emparejado previamente con LiCl (T2, C+) en comparación con el agua que contiene el otro sabor asociado con el olor que nunca se había combinado con LiCl (T1, C-). Los resultados de las pruebas se expresaron por el índice aversivo de la siguiente manera:

$$\text{Índice aversivo} = (\text{Consumo de C-} - \text{Consumo de C+}) / \text{Consumo total}$$

- 30 A los ratones se les administró THC (1 mg/kg, ip) o su vehículo 2 horas antes de la prueba de dos opciones que evaluaba la aversión mediada. Se administró 3pMBP (0,015; 0,05 mg/kg, *per os*) o su vehículo 3 horas antes que THC o su vehículo.

Resultados

- 35 Después de una inyección de solución salina, los animales no muestran aversión a un sabor que previamente estaba asociado al olor que durante el condicionamiento adquieren la propiedad de predecir el malestar inducido por LiCl (Figura 4D). Esta es una interpretación correcta ya que el sabor nunca ha sido asociado directamente al estímulo aversivo (la inyección de LiCl). Por el contrario, el THC induce aversión al mismo sabor, una respuesta conductual que indica que el animal está realizando una mala interpretación de los estímulos externos (Figura 4D). La 3pMBP administrada a 0,015 o 0,05 mg/kg previene completamente esta mala interpretación inducida por THC (1 mg/kg) con una DI100 de 0,015 mg/kg (Figura 4D).

g. Catalepsia inducida por THC

- 45 Estos experimentos tenían como objetivo evaluar la capacidad de 3pMBP para inhibir la catalepsia inducida por THC en ratones. La catalepsia se estudió porque puede considerarse como un modelo del estado catatónico observado en ciertos sujetos después del consumo de drogas cannabinoides (Khan *et al.*, 2016).

Material y métodos

- 50 Se estudiaron los efectos de 3pMBP en cuatro dosis (0,0015, 0,005, 0,015 o 0,05 mg/kg) en 5 ml/kg de aceite de maíz sobre la catalepsia inducida por THC (10 mg/kg en 10 ml/kg de NaCl al 0,9 % que contiene etanol al 2 % y Tween80 al 3%) en ratones macho C57BL6/J (24,8 ± 0,1 g, media ± SEM, al comienzo de los experimentos), una cepa que se utiliza habitualmente para este tipo de prueba (Vallée *et al.*, 2014). Se inyectó THC 3h00 después de 3pMBP. La medición de la catalepsia inducida por THC se inició 30 minutos después de la inyección de THC.

- 60 La catalepsia se midió mediante la prueba de barra de catalepsia. Las patas delanteras de los ratones se colocaron sobre una barra fijada horizontalmente a 3,5 cm de la superficie de la plataforma. La latencia para moverse desde la barra se registró con un tiempo de corte fijado en 420 s (7 min). Cada ratón se sometió a un máximo de cuatro ensayos consecutivos. Se seleccionó como medida de catalepsia la latencia máxima mostrada en un ensayo.

Resultados

- 65 3pMBP inhibió (en un 50 %) la catalepsia inducida por THC (10 mg/kg) con una DI₅₀≈0,005 y una DI₁₀₀≈0,05 mg/kg (Figura 5A).

h. Comportamiento de apertura de boca condicionado inducido por THC

La apertura de boca inducida por THC se utilizó en el presente documento como modelo del síndrome de hiperémesis de cannabinoides. Por tanto, aunque las ratas son incapaces de vomitar, demuestran profundas reacciones condicionadas de apertura de boca durante la reexposición a un sabor previamente asociado a un fármaco emético. Este aprendizaje sólido se produce en un solo ensayo y con largas demoras (horas) entre el consumo de un sabor novedoso y el tratamiento emético. Las reacciones de apertura de boca condicionadas se producen constantemente con fármacos eméticos y se previenen con fármacos antieméticos, lo que indica que son una medida sólida del malestar y las náuseas inducidas por un fármaco.

Material y métodos

Tres días después de la cirugía de canulación, las ratas se adaptaron a la cámara de reactividad gustativa. Las ratas se colocaron individualmente en una cámara de reacción gustativa (TR) con sus cánulas conectadas a una bomba de infusión para infundir agua en su cavidad intraoral durante un período de 2 minutos a una velocidad de 1 ml/min y, a continuación, se regresaron a su jaula. Las ratas recibieron el primero de tres ensayos de condicionamiento diarios tres días después de la prueba de adaptación. Las ratas se asignaron aleatoriamente a condiciones farmacológicas previas al tratamiento; 3pMBP 0,015 mg/kg (n=8), 3pMBP 0,005 mg/kg (n=8), Vehículo 0 mg/kg (n=8). Las ratas recibieron el fármaco de pretratamiento 3 horas antes del condicionamiento mediante sonda de alimentación. A continuación, se colocaron en la cámara TR y se les infundió una solución de sacarina al 0,1 % durante 2 minutos a una velocidad de 1 ml/min mientras se registraban las reacciones orofaciales. Inmediatamente después de la infusión de sacarina, las ratas se inyectaron (*per os*) con 10 mg/kg de THC o VEH y se regresaron a su jaula de origen. Veinticuatro horas después, las ratas se sometieron a un ensayo de prueba sin fármacos donde se colocaron en la cámara TR y se les infundió una solución de sacarina al 0,1 % durante 2 minutos a una velocidad de 1 ml/min y se registraron las reacciones orofaciales.

Resultados

Cuando se condicionaron con 10 mg/kg de THC, las ratas abrieron la boca más durante el ensayo de prueba que durante la prueba de condicionamiento. Como puede observarse en la Figura 5B, el pretratamiento con ambas dosis de 3pMBP (0,005 y 0,015 mg/kg) interfirió con el establecimiento de la apertura de boca condicionada al reducir el número medio de reacciones de apertura de boca (diferencia entre el vehículo y 3pMBP 0,005 mg/kg, $p = 0,023$, entre el vehículo y 3pMBP 0,015 mg/kg, $p = 0,029$).

i. Liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducida por THC

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar la capacidad de 3pMBP para inhibir el aumento de la liberación de dopamina (DA) inducida por THC en el núcleo accumbens (Nac) de ratas que se mueven libremente, medido mediante la técnica de microdialisis. Se estudió la liberación de DA en Nac porque se considera el principal sustrato biológico de las propiedades adictivas de las drogas de abuso, incluido el THC.

Materiales y métodos

Se probó el efecto de 3pMBP en tres dosis (0,005, 0,015 o 0,05 mg/kg, *per os*) sobre el aumento de la liberación de DA en Nac inducida por THC (1 mg/kg) en ratas macho Sprague-Dawley. El THC se solubilizó en NaCl al 0,9 % que contenía etanol (2 %) y Tween80 (2 %) que también se utilizó como vehículo de control (VEH_{THC}) y se administró por vía intraperitoneal en un volumen de 1 ml/kg.

A las ratas (n = 5-7 por grupo) se les implantó bajo anestesia una cánula guía justo encima de las subregiones de la corteza del Nac derecho. El día del experimento farmacológico (5-7 días después de la cirugía), las ratas que se movían libremente recibieron una de las dosis de 3pMBP o VEH_{3pMBP}, y se implantó la sonda de microdialisis en la cánula guía que, a continuación, se perfundió con líquido cefalorraquídeo artificial. Se recogieron dializados cada 15 minutos. 180 minutos después del inicio de la perfusión, todos los animales recibieron una inyección de THC. A continuación, se controló la salida de DA durante 120 minutos. Las concentraciones de DA en muestras de dializado se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa junto con detección electroquímica, como se ha descrito anteriormente (Leggio *et al.*, 2009). El contenido de DA en cada muestra se expresó como el porcentaje del nivel inicial promedio calculado a partir de las tres fracciones anteriores a la administración de THC. El área bajo la curva (ABC) se calculó para cada grupo desde el momento de muestreo de 0 min a 60 min después de la inyección de THC.

Resultados

3pMBP inhibe (DI₅₀≈0,005 y DI₁₀₀≈0,015 mg/kg) el aumento en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducido por 1 mg/kg de THC en ratas (Figuras 5C y 5D).

2. Inhibición por 3pMBP de la capacidad de THC y los agonistas de CB1 para condicionar el comportamiento e

inducir dependencia

Se estudió la inhibición por la administración oral de 3pMBP de los efectos farmacodinámicos condicionados de los agonistas de CB1 y el THC descritos a continuación:

- a. Autoadministración intravenosa del agonista de CB1 WIN 55,212-2;
- b. Autoadministración intravenosa de THC y restablecimiento de la búsqueda de THC.

a. Autoadministración intravenosa del agonista de CB1 WIN 55,212-2

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar en ratones la capacidad de 3pMBP para inhibir los efectos reforzadores del agonista de CB1 WIN 55,212-2 (WIN) según lo estudiado mediante la prueba de autoadministración intravenosa, que se considera la prueba de referencia para medir los efectos reforzantes de los fármacos.

Materiales y métodos

Los efectos de 3pMBP sobre la autoadministración intravenosa (iv) se midió en ratones macho CD1-Swiss.

Antes del inicio de las sesiones de autoadministración, a los ratones se les implantaron catéteres bajo anestesia en la vena yugular derecha. Los experimentos de autoadministración se realizaron 3 días después de la cirugía en cámaras operantes de ratón equipadas con un orificio "activo" y otro "inactivo". Cuando el animal insertaba su nariz (metió la nariz) en el agujero activo, recibía una infusión intravenosa de WIN (12,5 µg/kg). Los ratones se entrenaron bajo un programa de refuerzo de relación fija 1 (FR1).

Se realizaron sesiones de autoadministración de dos horas diarias, 6 días a la semana durante 19 días. Los ratones recibieron vehículo de aceite de maíz (2 ml/kg) *per os* los días 9 y 10 para adaptarse al procedimiento de gavaje oral. El día 11, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos (n=13 por grupo), uno recibió 3pMBP, el otro vehículo de aceite de maíz 3 horas antes del inicio de la sesión de autoadministración durante 9 días consecutivos. Se administró 3pMBP a 0,005 mg/kg los primeros cuatro días y a 0,015 mg/kg los cinco días restantes.

Resultados

3pMBP inhibe ($DI_{50} \approx 0,005$ y $DI_{100} \approx 0,015$ mg/kg) la autoadministración intravenosa de WIN 55,212-2 en ratones (Figura 6).

b. Autoadministración intravenosa de THC y restablecimiento de la búsqueda de THC en primates no humanos

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar la capacidad de 3pMBP para inhibir los efectos reforzadores del THC, en primates no humanos (monos ardilla), que es el modelo estándar de referencia para estudiar la adicción al cannabis y la recaída en animales. Se utilizaron dos modelos experimentales:

- Autoadministración intravenosa mediada por THC
- Restablecimiento de la búsqueda de THC mediado por el cebado de THC

Se utilizaron estos dos modelos porque se consideran los mejores modelos para medir respectivamente la propensión de un individuo a consumir cannabis y la probabilidad de recaer en el consumo de cannabis después de un período de abstinencia.

Materiales y métodos

Para todos los experimentos, se administró 3pMBP *per os* en una uva en un volumen de 0,1 ml de aceite de maíz 4 h antes de la prueba.

Se utilizaron cuatro monos ardilla machos (*Saimiri Sciureus*) porque son las especies en las que la autoadministración de THC puede estudiarse de forma más fiable.

Se entrenaron los monos para que presionaran una palanca para recibir una inyección intravenosa (iv) de THC (4 µg/kg/inyección) según un programa de inyección de fármaco de relación fija de diez respuestas (FR10, cada décima respuesta en la palanca producía una inyección de THC).

Se registró el número de pulsaciones de palanca y el número de inyecciones por sesión. Las tasas de respuesta se calculan en función del tiempo de sesión disponible para responder (es decir, se resta el tiempo de espera). Se realizan estadísticas para el número de inyecciones y las tasas de respuesta por sesión utilizando ANOVA de medidas repetidas unidireccional o bidireccional con la dosis de THC o el tiempo como factores.

Los monos utilizados en los experimentos anteriores se sometieron a sesiones de extinción diarias durante las cuales al presionar la palanca se les infundía vehículo más las señales visuales previamente asociadas a infusiones de THC, pero no THC. Después de al menos dos sesiones de extinción, cuando la respuesta había alcanzado un nivel bajo, se determinó el efecto del pretratamiento con 3pMBP (0,0015, 0,005 y 0,015 mg/kg) o vehículo de control de 3pMBP sobre el restablecimiento de la búsqueda de THC inducido por cebado con THC (0,04 mg/kg iv). Las inyecciones de cebado de THC se administraron inmediatamente antes del inicio de las sesiones de prueba. Durante las pruebas, las pulsaciones de palanca (FR10) continuaron produciendo solo inyecciones de vehículo y señales discretas. También se probaron el efecto de 0,015 mg/kg de 3pMBP en el cebado del vehículo para determinar si 3pMBP por sí mismo afectaría la respuesta después de la extinción.

Resultados

3pMBP inhibe ($DI_{50} \approx 0,005$ y $DI_{100} \approx 0,015$ mg/kg) la autoadministración intravenosa de THC en primates no humanos (monos ardilla) (Figura 7A y 7B). 3pMBP también inhibía ($DI_{100} \leq 0,0015$ mg/kg) el restablecimiento de la búsqueda de THC en primates no humanos (monos ardilla) inducido por el cebado de THC, pero no tuvo efecto sobre el cebado del vehículo (Figuras 7C y 7D).

Conclusión

Los resultados de los experimentos para evaluar los efectos de 3pMBP sobre los efectos condicionados e incondicionados del THC se informan en la siguiente tabla (Tabla 4). Esta tabla muestra claramente que 3pMBP es muy potente para inhibir un amplio espectro de efectos del THC relacionados con varios trastornos que aparecen después del consumo de cannabinoides. Por consiguiente, 3pMBP aparece como un tratamiento general de los trastornos relacionados con los cannabinoides.

Tabla 4: Sumario de la evaluación preclínica de 3pMBP como tratamiento de los trastornos relacionados con los cannabinoides

	Sistema de prueba	DI50 (mg/kg)	DI100 (mg/kg)	% de inhibición
Efectos incondicionados del THC				
Aumento de la ingesta de alimentos inducido por THC	ratones	0,015	0,05	100
Aumento de la estimulación psicomotora inducido por THC	ratones	0,00036	0,0015	100
Deterioro de la inhibición prepulso inducido por THC	ratones	0,0045	0,015	100
Deterioro de la memoria de trabajo inducido por THC	ratones	ND	0,15	100
Deterioro de la memoria a largo plazo inducido por THC	ratones	<0,005	ND	100
Deterioro de la interacción social inducido por THC	ratones	0,005	0,015	100
Deterioro de las pruebas de realidad inducido por THC	ratones	<0,015	ND	100
Catalepsia inducida por THC	ratones	0,005	0,05	50
Comportamiento de apertura de boca inducido por THC	ratas	<0,005	ND	50
Deterioro de la liberación de dopamina inducido por THC	ratas	0,005	0,015	50
Efectos condicionados del THC y WIN 55,212-2				
Autoadministración intravenosa del agonista de CB1 WIN 55,212-2	ratones	0,005	0,015	80
Autoadministración intravenosa de THC	monos	0,005	0,015	80
Restablecimiento de la búsqueda de THC	monos	<0,0015	ND	80
ND= No determinado				

Ejemplo 4: 3pMBP no tiene ninguno de los efectos secundarios conductuales y endocrinológicos de los antagonistas ortostéricos de CB1

Se compararon el perfil farmacológico y los efectos sobre los fenotipos relacionados con los efectos adversos de 3pMBP y el antagonista ortostérico de CB1 rimonabant. Antagonistas ortostéricos de CB1 tales como Acomplia® fueron retirados del mercado debido a efectos adversos. Por consiguiente, para que una herramienta terapéutica que inhibe el CB1 sea de uso práctico en seres humanos no debe tener los efectos adversos conocidos de los antagonistas ortostéricos de CB1.

Los efectos adversos conocidos de los antagonistas ortostéricos de los receptores CB1 y, en particular, del rimonabant son: 1. Una reducción de la ingesta de alimentos y del peso corporal que es un signo de un efecto no específico sobre las vías de recompensa; 2. Una inducción de comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión; 3. Un aumento en la secreción de glucocorticoides que induce un deterioro del estado hormonal del sujeto; 4. Una inducción de la abstinencia precipitada en sujetos dependientes de cannabinoides.

A continuación, los inventores analizaron los efectos de 3pMBP en todos estos parámetros.

1. Efectos de un tratamiento repetido con 3pMBP sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar la capacidad de un tratamiento repetido con 3pMBP para disminuir la ingesta de alimentos y el peso corporal en un modelo de ratón con obesidad inducida por dieta (DIO) y comparar estos efectos con los del antagonista ortostérico de CB1 rimonabant. Se estudiaron el peso corporal y la ingesta de alimentos porque se reducen con el tratamiento repetido con antagonistas ortostéricos de CB1 tanto en ratones como en seres humanos (Wiley *et al.*, 2005; Mazier *et al.*, 2015; Bermúdez-Silva FJ, *et al.*, 2012). Se utilizaron ratones DIO porque los efectos del antagonista de CB1 son de mayor amplitud en ratones obesos que en ratones delgados.

Métodos y materiales

Se alimentaron *ad libitum* ratones macho C57BL/6J con una dieta rica en grasas (HFD) durante 8 semanas antes del inicio de los tratamientos farmacológicos. Durante los tratamientos farmacológicos, se mantuvo la HFD y se midieron diariamente la ingesta de alimentos y el peso corporal. La comida consumida se calculó restando la comida que quedó en las tolvas de la cantidad pesada previamente inicial. En un primer experimento (n=10-7 por grupo), se analizó el efecto de 3pMBP (0, 0,005, 0,015 y 0,05 mg/kg; en 2 ml/kg de aceite de maíz) durante cuatro semanas. En un segundo experimento (n=8 por grupo), se compararon los efectos de 3pMBP (0, 5 y 15 mg/kg en 5 ml/kg de aceite de maíz) con los de rimonabant (10 mg/kg en 5 ml/kg de aceite de maíz) durante dos semanas de tratamiento. Se administraron 3pMBP y rimonabant mediante gavaje oral una vez al día, dos horas antes del inicio de la fase de oscuridad del ciclo de luz/oscuridad.

Resultados

3pMBP en ninguna de las dosis probadas modificó la ingesta de alimentos o el peso corporal durante todo el experimento (cuatro semanas para 0,005, 0,015 y 0,05 mg/kg y dos semanas para 5 y 15 mg/kg). Por el contrario, el antagonista de CB1 rimonabant disminuyó tanto la ingesta de alimentos como el peso corporal (Figuras 8A y 8B).

2. Efectos de 3pMBP sobre la retirada precipitada

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar la capacidad de 3pMBP para precipitar la abstinencia en ratones tratados crónicamente con THC. Se estudió la abstinencia precipitada porque podría constituir un posible efecto secundario de un inhibidor de THC en sujetos dependientes de cannabinoides. Por ejemplo, se sabe que el antagonista ortostérico de CB1, rimonabant, precipita la abstinencia en ratones tratados crónicamente con THC.

Materiales y métodos

El régimen crónico de THC (20 mg/kg, dos veces al día) utilizado en estos experimentos ha sido elegido porque imita el consumo intenso de marihuana (Cook *et al.*, 1998) y se considera un modelo de dependencia de cannabinoides en ratones (Cutando *et al.*, 2013; Hutcheson *et al.*, 1998). Se estudiaron los efectos de rimonabant (10 mg/kg) y de 3pMBP (0,15 mg/kg) en experimentos independientes en ratones CD1-Swiss. A partir de los días 1 a 4-5, a los ratones se les inyectó ip vehículo o THC (20 mg/kg en NaCl al 0,9 % que contenía 2 % de etanol y 2 % de Tween80, 10 ml/kg) dos veces al día. En el último día del tratamiento, los ratones en el grupo de THC recibieron la administración de rimonabant o 3pMBP. Todos los otros animales recibieron la administración del respectivo vehículo. Las grabaciones se analizaron durante 45 min inmediatamente (rimonabant) o 3 h (3pMBP) después de la administración. La dosis y el calendario de administración de rimonabant elegidos para este estudio se han utilizado habitualmente para precipitar la abstinencia de THC en ratones (Cook *et al.* 1998, Hutcheson *et al.*, 1998, Huang *et al.*, 2009).

Para la medida de la abstinencia precipitada, los ratones se colocaron en una jaula nueva y una cámara de video colocada frente a cada jaula registró los comportamientos de los animales. La puntuación se realizó durante 1 minuto cada período de 5 minutos. Se analizaron dos signos de abstinencia: temblores de patas y movimiento de cabeza, ya que son los signos más comunes de abstinencia de THC observados en ratones (Cook *et al.* 1998, Hutcheson *et al.*, 1998, Lichtman *et al.*, 2001).

Resultados

3pMBP no precipitó la abstinencia en ratones. Por el contrario, en las mismas condiciones experimentales, los signos de abstinencia aparecieron después de la administración del antagonista ortostérico de CB1 rimonabant (Figuras 8C y 8D).

3. Efectos de una administración repetida de 3pMBP sobre comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión en ratones

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar la capacidad de un tratamiento repetido con 3pMBP para aumentar los comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión en ratones y comparar estos efectos potenciales con los del antagonista ortostérico de CB1 rimonabant. Se estudiaron los comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión porque un aumento de la ansiedad y la depresión son consecuencias del tratamiento repetido con antagonistas ortostéricos de CB1 tanto en roedores como en seres humanos (Bellocchio *et al.*, 2013, Patel *et al.*, 2006, Moreira *et al.*, 2009, Tzavara *et al.*, 2003). Los comportamientos similares a la ansiedad se estudiaron en el laberinto en cruz elevado (EPM) porque este modelo se utiliza ampliamente en roedores para evaluar los supuestos efectos ansiogénicos o ansiolíticos de compuestos farmacológicos (Walf *et al.*, 2007). Los comportamientos relacionados con la depresión se estudiaron utilizando la prueba de preferencia de sacarosa que se utiliza ampliamente como modelo de anhedonia, uno de los síntomas fundamental de la depresión.

Material y métodos

El aparato de EPM estaba formado por cuatro brazos elevados dispuestos en forma de cruz, con dos brazos opuestos cerrados por paredes y los otros dos brazos abiertos. Para todos los experimentos, después de recibir el tratamiento adecuado, los ratones se colocaron en el centro del EPM y se les dejó explorar el laberinto durante 5 minutos. El tiempo transcurrido y el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados se midieron mediante un sistema de seguimiento automático por vídeo. Una disminución en los porcentajes de visitas y/o del tiempo pasado en brazos abiertos se considera un índice de aumento de los niveles de ansiedad.

La prueba de preferencia de sacarosa se realizó en la jaula de los ratones. Dos botellas idénticas, una que contenía agua y la otra que contenía una solución de sacarosa al 2 % se colocaron en la tolva de cada jaula. Los ratones tenían acceso ilimitado a agua y soluciones de sacarosa durante la fase de actividad, la fase oscura del ciclo luz/oscuridad que comenzó a las 7 pm. Los volúmenes de agua y de soluciones de sacarosa bebidos por los ratones se midieron durante dos intervalos de 1,30 h, el primero entre las 7:00 pm, y las 8:30 pm y el segundo entre las 8:30 pm y las 10:00 pm. En cada punto temporal, se pesaron las botellas y se calculó el volumen de ingesta restando el peso inicial de la botella al peso final de la botella.

Los ratones macho C57BL/6J (n=6-8 por grupo) recibieron una administración diaria de 3pMBP (0,05; 5 o 15 mg/kg), rimonabant (10 mg/kg) o de los respectivos vehículos durante 28 días. El día 26, los ratones se sometieron al EPM y el día 28 a la prueba de preferencia de sacarosa. Todos los procedimientos conductuales comenzaron 3 horas después del tratamiento con 3pMBP o vehículo de 3pMBP (0 mg/kg) y 30 minutos después del tratamiento con rimonabant o vehículo de rimonabant (0 mg/kg).

Resultados

3pMBP no tuvo efectos sobre los comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión, como se midió en el EPM (Figuras 9A y 9B) y la prueba de preferencia de sacarosa (Figura 9C), respectivamente. Por el contrario, rimonabant aumentó el comportamiento relacionado con la ansiedad y la depresión, como lo demuestra la disminución del tiempo de permanencia en los brazos abiertos del EPM (Figura 9A) y del porcentaje de visitas en los brazos abiertos (Figura 9B) y la disminución de la preferencia por sacarosa (Figura 9D).

4. Efectos de 3pMBP sobre la secreción de glucocorticoides en ratones

Estos experimentos tenían como objetivo evaluar en ratones los efectos de 3pMBP sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona, el principal glucocorticoide producido por la glándula suprarrenal en roedores correspondiente al cortisol en seres humanos. Se estudiaron los efectos de 3pMBP sobre los niveles de corticosterona porque el antagonista ortostérico de CB1 rimonabant aumenta las concentraciones plasmáticas de corticosterona (Steiner *et al.*, 2008).

Materiales y métodos

Se estudiaron los efectos de 3pMBP (0,3 y 10 mg/kg) o vehículo (VEH) sobre los niveles plasmáticos de corticosterona en ratones suizos CD-1 machos y hembras. La muestra de sangre se realizó 2, 5, 8 y 24 h después de la dosis (n = 3 por sexo, por dosis y por tiempo de muestreo). Para tomar muestras de sangre, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se extrajo sangre mediante punción cardíaca. La sangre se centrifugó, se tomó plasma y se congeló a -80 °C hasta las cuantificaciones de corticosterona mediante GC-MS/MS (cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem) utilizando un método GC-MS validado descrito en otro lugar (Vallée *et al.*, 2014; Valle *et al.*, 2000; George *et al.*, 2010).

Resultados

3pMBP a 0,3 y 10 mg/kg no aumentó la secreción de glucocorticoides en ratones macho (Figura 10A) y hembra (Figura 10B).

Conclusión

Los efectos adversos de rimonabant se comparan con los efectos de 3pMBP en la tabla 5.

Tabla 5: 3pMBP no tiene ninguno de los efectos adversos del rimonabant

IN VIVO	SISTEMA DE PRUEBA	3pMBP			Rimonabant		
		Efecto	Dosis más alta probada (mg/kg)	N veces CI50*	Efecto	CI100 (mg/kg)	N veces CI100**
Inhibición de la ingesta de alimentos y del peso corporal (administración repetida)	ratones macho	No	15	3000	Sí	10	1
Abstinencia precipitada en ratones dependientes de THC	ratones macho	No	0,15	30	Sí	10	1
Aumento de comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión (administración repetida)	ratones macho	No	15	3000	Sí	10	1
Aumento de la secreción de glucocorticoides	ratones hembra + macho	No	10	2000	Sí	2	0,2 [#]
*= 0,005 mg/kg la DI ₅₀ más observada de 3pMBP para inhibir los efectos conductuales del THC; **= Referencia DI ₁₀₀ para efectos de rimonabant = 10 mg/kg. #= de Steiner <i>et al.</i> , 2008							

Los efectos de 3pMBP son muy diferentes a los del antagonista ortostérico de CB1, rimonabant.

3pMBP no tiene ninguno de los efectos adversos típicos del rimonabant y otros antagonistas ortostéricos de CB1, tal como la disminución de la ingesta de alimentos, aumento de los comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión, abstinencia precipitada en animales dependientes de THC y aumento de la secreción de glucocorticoides.

Se observó esta falta de efectos de 3pMBP para todas las dosis más altas utilizadas en cada prueba. Estas dosis fueron varias veces superiores (en mg/kg) que la DI₅₀ (0,005 mg/kg) de 3pMBP para inhibir la autoadministración de agonistas de CB1 y THC, respectivamente: 30 veces mayor para la abstinencia precipitada; 2.000 veces mayor para la secreción de glucocorticoides; y 3.000 veces mayor para la ingesta de alimentos, el peso corporal, los comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión.

Ejemplo 5: 3pMBP no tiene ningún efecto sobre el comportamiento espontáneo en ratones.

Además de no tener los mismos efectos conductuales adversos que los antagonistas ortostéricos de CB1, 3pMBP no tenía efectos detectables sobre el comportamiento en sí mismo en roedores como lo muestra el análisis en video del comportamiento espontáneo en la jaula de la casa durante 24 horas después de la administración de 3pMBP en ratones a 15 mg/kg.

Ejemplo 6: 3pMBP no tiene ningún efecto sobre el estado de ánimo y el rendimiento cognitivo en seres humanos.

Estos experimentos fueron diseñados para evaluar los efectos de dosis ascendentes únicas y repetidas de 3pMBP sobre el estado de ánimo, la cognición y las tendencias suicidas en seres humanos utilizando una batería de pruebas validadas.

Material y métodos

Se realizaron dos estudios. En el primer estudio, cohortes independientes de voluntarios sanos recibieron una única administración de 3pMBP en una de las 3 dosis crecientes (0,2, 0,6; 2 mg/sujeto) o placebo. En cada cohorte de dosis, utilizando un procedimiento con doble enmascaramiento, 6 sujetos recibieron la dosis asignada de 3pMBP y 2 sujetos recibieron placebo. En el segundo estudio, cohortes independientes de voluntarios sanos recibieron administraciones repetidas de 0,6 mg/sujeto de 3pMBP (una vez al día durante 7 días). En cada cohorte de dosis, utilizando un

procedimiento con doble enmascaramiento, 6 sujetos recibieron la dosis asignada de 3pMBP y 2 sujetos recibieron placebo. La dosis de 0,2 mg/sujeto induce un aumento de las concentraciones plasmáticas de 3pMBP que están en el intervalo de lo observado en la DE₁₀₀ más observada (0,015 mg/kg) para la inhibición de los efectos conductuales del THC en roedores.

En ambos estudios, después de la dosis de 3p MBP los sujetos también se sometieron a una observación general de su comportamiento por parte de un médico certificado y se realizaron las siguientes pruebas.

Bond & Lader VAS

La escala analógica visual de Bond y Lader (Bond y Lader, 1974) consiste en 16 líneas bipolares de autocalificación de 100 mm de largo entre dos adjetivos opuestos. La prueba está asistida por ordenador. El sujeto tiene que indicar en cada línea cómo se siente en el momento de la prueba, usando el ratón. La respuesta se puntúa midiendo la distancia en mm entre el extremo izquierdo de la línea y la marca del sujeto. La puntuación consiste en tres subpuntuaciones de factores derivados: alerta, satisfacción (bienestar) y tranquilidad. Una puntuación más alta indica un mayor estado de alerta, satisfacción y tranquilidad.

ARCI 49

Este cuestionario autoadministrado y asistido por ordenador consiste en 49 puntos. Cada pregunta aparece una a una en la pantalla. Usando el ratón, el sujeto debe hacer clic en "falso" o "verdadero" en cada punto, con respecto a lo que está sintiendo en el momento en que lo lee. Luego, se derivan 5 puntuaciones: PCAG (Escala de grupo de alcohol pentobarbital clorpromazina), BG (grupo Benzedrina), AG (Escala de grupo de anfetaminas), LSD (escala de grupo de LSD) y MBG (escala de grupo de morfina-benzedrina) (Martín *et al.*, 1971).

POMS 65

La escala del perfil de estado de ánimo consiste en 65 adjetivos que describen diversos sentimientos del estado de ánimo (Mc Nair *et al.*, 1992; Cayrou *et al.*, 2000; Cayrou *et al.*, 2003).

Esta versión es una versión computarizada. Cada adjetivo aparece uno por uno en la pantalla y se le pide al sujeto que describa cómo estos adjetivos reflejan su estado de ánimo en el momento en que está cumplimentando el cuestionario, calificando cada descripción en una escala de 5 puntos de conformidad creciente: desde "nada" hasta "extremadamente".

Del cuestionario se derivan clásicamente seis puntuaciones: tensión-ansiedad (TA); depresión - abatimiento (DD); ira - hostilidad (AH); vigor - actividad (VA); fatiga - inercia (FI); confusión - desconcierto (CB).

Escala de calificación de la gravedad del suicidio de Columbia (C-SSRS)

La relación entre los medicamentos que ingresan al SNC y el potencial de tendencias suicidas (ideación y conducta suicidas) ha recibido recientemente una mayor atención por parte de las agencias reguladoras, tal como la FDA, y ha surgido la necesidad de implementar de manera proactiva mecanismos más consistentes y estrictos de recopilación de datos en los ensayos clínicos.

La evaluación prospectiva del suicidio se recopila mediante la escala de calificación de la gravedad del suicidio de Columbia (C-SSRS). La C-SSRS está diseñada para evaluar tanto la conducta suicida como la ideación suicida y consiste en dos cuestionarios: uno diseñado para la evaluación inicial (cubre la vida del sujeto hasta la visita inicial) y otro utilizado durante el estudio (cuestionario "desde la última visita").

Resultados

Para todas las dosis de 3pMBP probadas no hubo modificación en el comportamiento general del sujeto ni en ninguna de las pruebas psicométricas realizadas. En particular, ninguna modificación en la prueba ARCI-49 indica que los sujetos no puedan decir que han recibido una sustancia psicoactiva.

En conclusión, los datos muestran que, en los seres humanos, como se observa en los animales, la administración de 3pMBP no modifica significativamente el comportamiento basal, el estado de ánimo y el rendimiento cognitivo.

Ejemplo 7: Comparación de la farmacología de seguridad y la toxicología de 3pMBP con rimonabant

1. Evaluación de la farmacología de seguridad de BPL de 3pMBP

Materiales y métodos

Evaluación de los efectos de 3pMBP sobre la corriente hERG en células HEK-293 transfectadas de manera estable:

El objetivo de este estudio fue evaluar cualquier posible efecto de 3pMBP sobre la corriente de cola de hERG en células HEK-293 transfectadas de manera estable. El estudio se llevó a cabo siguiendo los requisitos generales de BPL y el diseño del estudio sigue las directrices de ICH S7A (2001) para farmacología de seguridad.

- 5 3pMBP se estudió en 3 células HEK-293 transfectadas de manera estable con hERG. En cada célula, se probaron los siguientes tratamientos: Tyrode; Vehículo de 3pMBP (DMSO al 0,3 % en Tyrode) y 3pMBP a $10,98 \times 10^{-8}$ M, $10,98 \times 10^{-7}$ M y 3pMBP a $10,98 \times 10^{-6}$ M.

10 Se usó E-4031 como control positivo y se probó en una celda HEK-293 separada para respaldar la validez del método utilizado.

15 Las células se sujetaron a -80 mV, se despolarizado a 0 mV durante 5 segundos, permitiendo la activación de la corriente de hERG y se repolarizado a -50 mV durante 5 segundos, permitiendo la desactivación de la corriente de cola hERG. Este procedimiento experimental se repitió a una frecuencia de 0,06 Hz. Las corrientes se filtraron a 1 kHz y se adquirieron a una frecuencia de 2 kHz. Se midió la amplitud de la corriente de cola de hERG durante el pulso de repolarización de 0 a -50 mV. Las células se perfundieron con solución de Tyrode y posteriormente con solución de Tyrode que contenía 3pMBP durante al menos 5 minutos hasta que se alcanzó el estado estacionario para cada período de perfusión. Las corrientes se midieron antes y después de la exposición al elemento de prueba.

20 *Efecto de 3pMBP sobre las pruebas de Irwin y la temperatura corporal en ratas:*

El objetivo de este estudio fue evaluar los posibles efectos neuroconductuales y los efectos sobre la temperatura corporal de 3pMBP tras una única administración oral en las ratas.

- 25 El estudio se llevó a cabo siguiendo los requisitos generales de BPL y el diseño del estudio sigue la directriz ICH S7A (2001) para farmacología de seguridad.

30 En el estudio participaron 4 grupos de 6 ratas Wistar macho que pesaban entre 154,0 y 185,9 g. A los grupos se les administró respectivamente vehículo (aceite de maíz, es decir, grupo de control) o 3pMBP a 2, 9 o 36 mg/kg.

El día de estudio, en primer lugar, los animales se calificaron mediante la batería de observación estandarizada de Irwin y se midió la temperatura corporal. Posteriormente, se les administró por vía oral una de las dosis de 3pMBP o su vehículo en un volumen de 4 ml/kg. A continuación, se realizaron nuevamente las puntuaciones de Irwin, así como la medición de la temperatura corporal a las 1, 3, 6, 8 y 24 horas después de la administración.

35 *Evaluación del efecto de 3pMBP sobre la respiración en ratas conscientes sin restricciones después de una sola administración oral*

40 El objetivo de este estudio era evaluar cualquier posible efecto de una única administración oral de 3pMBP sobre los parámetros respiratorios (frecuencia respiratoria, flujos inspiratorio máximo y espiratorio máximo, tiempos de inspiración y espiración, índice de resistencia de las vías respiratorias, volumen corriente y volumen minuto) medidos mediante el método de pletismografía de cuerpo entero en ratas conscientes.

45 El estudio se llevó a cabo siguiendo los requisitos generales de BPL y el diseño del estudio sigue la directriz ICH S7A (2001) para farmacología de seguridad.

En el estudio participaron 4 grupos de 6 ratas Wistar macho, a los grupos se les administró respectivamente vehículo (aceite de maíz, es decir, grupo de control) o 3pMBP a 2, 9 o 36 mg/kg.

50 El día antes del estudio, a los animales sólo se les permitía beber agua. El día del estudio, los animales se colocaron en el pletismógrafo y las mediciones comenzaron inmediatamente después. El método de pletismografía de cuerpo entero mide en una cámara cerrada las variaciones en el flujo de aire debido a los movimientos de la caja torácica durante la respiración y permite medir los parámetros respiratorios en el animal consciente, totalmente libre para moverse. Al menos 15 minutos después del inicio de las mediciones, a los animales se les administró 3pMBP o su vehículo por vía oral en un volumen de 4 ml/kg. La respiración se registró durante un período total de 6 horas después de la dosificación. Los parámetros respiratorios se determinaron a partir del análisis de los ciclos respiratorios.

60 *Evaluación de los efectos de 3pMBP sobre la presión arterial, frecuencia cardíaca, electrocardiograma y temperatura corporal después de una única administración oral a perros conscientes*

El objetivo de este estudio era evaluar los posibles efectos de 3pMBP sobre la presión arterial, frecuencia cardíaca, temperatura corporal y electrocardiograma después de una única administración oral a perros conscientes.

65 El estudio se llevó a cabo siguiendo los requisitos generales de BPL y el diseño del estudio sigue la directriz ICH S7A (2001) para farmacología de seguridad.

En el estudio participaron 4 machos Beagle que previamente estaban equipados con transmisores de telemetría para la presión arterial, mediciones de temperatura corporal y electrocardiograma.

El estudio se realizó en dos partes. En la parte I, cada animal recibió vehículo (es decir, aceite de maíz), 3pMBP a 2, 9 y 36 mg/kg por vía oral de acuerdo con un diseño de dosis ascendente con un período de lavado de una semana entre dosis. Las mediciones de telemetría de la presión arterial, frecuencia cardíaca, temperatura corporal y el electrocardiograma (derivación epicárdica II) comenzaron al menos 2 horas antes de cada dosis y continuaron durante al menos 24 horas después de la dosis. En la parte II, a los animales se administró nuevamente 3pMBP a 9 o 36 mg/kg (n=2 por nivel de dosis) por vía oral para investigaciones complementarias, es decir, muestreo de sangre y observación de animales.

Resultados

3pMBP no mostró ningún efecto adverso en las pruebas farmacológicas de seguridad de BPL:

1. *In vitro*, 3pMBP (100 nM, 1 µM y 10 µM) no modificó las corrientes de cola de hERG (gen relacionado con éter-a-go-go humano) en células HEK-293 transfectadas de manera estable con ADNc de hERG-1.

2. *In vivo*, 3pMBP (2, 9 y 36 mg/kg) no modificó: a. El comportamiento (prueba de Irwin) y la temperatura corporal en ratas; b. la respiración en ratas conscientes; y c. la presión arterial, frecuencia cardíaca, electrocardiograma y temperatura corporal en perros conscientes.

El único efecto informado fue una disminución en los ritmos de alta frecuencia y oscilaciones de la frecuencia cardíaca asociada a una disminución en la variabilidad de la frecuencia cardíaca con la dosis de 9 mg/kg solo en el perro. Este hallazgo sugiere un efecto sobre el equilibrio autónomo y, de manera más precisa, una disminución de la actividad vagal. No obstante, este efecto fue leve ya que no provocó ningún cambio en la frecuencia cardíaca y no puede considerarse un efecto adverso por sí solo.

2. Evaluación toxicológica de BPL de 3pMBP

Materiales y métodos

Se ha probado los efectos citotóxicos, mutagénicos y genotóxicos de 3pMBP hasta las concentraciones máximas aceptables para los sistemas de prueba, es decir, entre 74 y 100 µM.

Estas dosis son aproximadamente 7.400 y 10.000 más altas que la CI_{50} más alta de 3pMBP (10 nM) para inhibir los efectos celulares del THC mediados por CB1.

Los estudios de toxicología *in vitro* realizados para caracterizar 3pMBP fueron: 1. La prueba AMES +/- activación metabólica (BPL); 2. La prueba de aberración cromosómica humana +/- activación metabólica (BPL); 3. Citotoxicidad en cultivo primario de neuronas y hepatocitos (no BPL). Se realizaron estudios de toxicidad a dosis repetidas en ratas y perros. Se seleccionaron estas dos especies porque ambas expresan el receptor de CB1 y se han utilizado de manera clásica y con éxito para identificar los efectos tóxicos de los antagonistas ortostéricos de CB1, tales como rimonabant. Además, el supuesto sitio de unión de pregnenolona tiene una homología del 100 % en ratas, perros y seres humanos. Finalmente, los estudios de unión a proteínas sugieren que la unión de 3pMBP no difirió entre ratas (84-94 %), perros (84-105 %) y humanos (88-98 %), mientras que parecía mayor en los monos (97-99 %).

Los estudios de toxicología repetidos realizados para caracterizar 3pMBP fueron estudios de toxicidad oral (BPL) de 28 días en ratas y perros con tres dosis (2 mg/kg, 9 mg/kg y 36 mg/kg).

Resultados

Estudios *in vitro*

3pMBP no mostró ninguna citotoxicidad, genotoxicidad y mutagénesis incluso a la concentración más alta probada (entre 74 y 100 µM). Las concentraciones de 74 y 100 µM de 3pMBP son 7.400-10.000 veces mayores que la CI_{50} de 3pMBP para inhibir la fosforilación de MAPK dependiente de CB1.

Estudios *in vivo*

Tabla 6: Sumario de los estudios de toxicidad *in vivo* con 3pMBP en ratas y perros

	Toxicología oral de dosis múltiples			
Días de tratamiento	28	28	28	28 (+14)
Dosis de 3pMBP (mg/kg)	2	9	36	36
Vehículo aceite de maíz (ml/kg)	4	4	4	4

(continuación)

	Toxicología oral de dosis múltiples			
Número de ratas	10M, 10F	10M, 10F	10M, 10F	10M, 10F
Numero de perros	3M, 3F	3M, 3F	3M, 3F	2M, 2F
Mortalidad	ENO	ENO	ENO	ENO
Signos clínicos	ENO	ENO	ENO	ENO
Temperatura corporal	ENO	ENO	ENO	ENO
Peso corporal	ENO	ENO	ENO	ENO
Consumo de comida	ENO	ENO	ENO	ENO
Oftamología	ENO	ENO	ENO	ENO
Parámetros cardiovasculares	NA _R , ENO _P	NA _R , ENO _P	NA _R , ENO _P	NA
Hematología y coagulación	ENO	ENO	ENO	ENO
Análisis bioquímico de la sangre	EANO _R , ENO _P	EANO _R , ENO _P	EANO _R , ENO _P	EANO _R , ENO _P
Análisis de orina	EANO _R , ENO _P	EANO _R , ENO _P	EANO _R , ENO _P	EANO _R , ENO _P
Peso del órgano	EANO _R , ENO _P	EANO _R , ENO _P	EANO _R , ENO _P	EANO _R , ENO _P
Hallazgos macroscópicos	ENO	ENO	ENO	ENO
Histopatología	ENO	ENO	ENO	ENO
M = machos; F = hembras; ENO= efectos no observados; EANO= efectos adversos no observados; NA=no analizado; si no se especifica, los efectos se observaron tanto en ratas como en perros. EANO _R y ENO _R = cambio observado sólo en la rata; EANO _P y ENO _P = cambio observado sólo en el perro.				

In vivo, 3pMBP tiene en la rata un NEANO (nivel de efectos adversos no observados) >36 mg/kg/día/28 días y en el perro un NENO (nivel de efectos no observados) >36 mg/kg/día/28 días.

Considerando que la DI₅₀ más observada de 3pMBP para inhibir los efectos del THC en ratones, ratas y primates no humanos es de 0,005 mg/kg, 3pMBP tiene un índice terapéutico (IT) > 7.200.

Conclusión

En función de los resultados de los experimentos de toxicología, 3pMBP muestra un perfil de toxicidad favorable con un IT >7.200. Un IT tan grande podría ser el resultado de dos características de 3pMBP: 1. Un mecanismo de acción (MdA) único y muy selectivo que no se encuentra en otros medicamentos aprobados y, según nuestro conocimiento, aún no probado en otros desarrollos preclínicos. Por tanto, 3pMBP parece inhibir únicamente la actividad de una de las vías de señalización inducida por THC (MAPK) y no tiene ningún efecto sobre el THC independiente, fenotipos mediados por CB1 *in vivo*.

2. Una baja conversión a metabolitos derivados de drogas que muy a menudo son responsables de la toxicidad *in vivo* de las NCE.

Como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 7), el perfil de seguridad y toxicidad de 3pMBP fue muy diferente del perfil del antagonista ortostérico de CB1 rimonabant. Por tanto, rimonabant indujo varios acontecimientos adversos a dosis bastante cercanas a la dosis terapéutica y, en particular, convulsiones clónicas, hepatotoxicidad y varias alteraciones profundas del comportamiento.

Tabla 7 Comparación del efecto tóxico de 3pMBP y rimonabant en estudios de BPL

Toxicidad en estudios de BPL	antagonista de CB ₁ (Rimonabant)			3pMBP		
	Efecto	DE100 (mg/kg)	Índice de seguridad	Efecto	Dosis más alta probada (mg/kg)	Índice de seguridad
Toxicidad aguda	(ip) roedor			(oral) rata		
Toxicidad clínica: decúbito, prostación, una actividad disminuida, debilidad, piloerección, área urogenital sucia, secreción nasal	Sí	60	6	No	36	>7200
Toxicidad del SNC: hiperactividad locomotora seguida de sedación	Sí	3	0,3	No	36	>7200
Convulsión clónica	Sí	60	6	No	36	>7200

(continuación)

Toxicidad en estudios de BPL	antagonista de CB ₁ (Rimonabant)			3pMBP				
	Efecto	DE100 (mg/kg)	Índice de seguridad	Efecto	Dosis más alta probada (mg/kg)		Índice de seguridad	
Toxicidad aguda	(ip) roedor			(oral) rata				
Dosis máxima no letal	Sí	60	6	No	36	>7200		
Toxicidad por dosis repetida (oral) RATA								
Toxicidad clínica: delgadez, sangre seca en el hocico, hinchazón alrededor de los ojos y exudados rojos/lagrimo de los ojos, área urogenital sucia, piloerección, deshidratación, hipotonía, pérdida del equilibrio	Sí	6 (Hembras)	0,6 (Hembras)	No	36	>7200		
		40 (Machos)	4 (Machos)					
Toxicidad del SNC: Hiperexcitabilidad: hiperestesia, hiperestesia táctil o hipersensibilidad al tacto, rascado excesivo, hiperexcitabilidad, hiperactividad, hipermotilidad, agresividad y comportamiento combativo	Sí	30	3	No	36	>7200		
Convulsión clónica	Sí	6 (Hembras)	0,6 (Hembras)	No	36	>7200		
		40 (Machos)	4 (Machos)					
Toxicidad hepática: Necrosis hepatocelular focal, esteatosis, Aumento del peso y tamaño del hígado, hipertrofia de los hepatocitos centrolobulillares con apariencia de vidrio esmerilado del citoplasma e hiperplasia del retículo endoplásmico liso.	Sí	40	4	No	36	>7200		
Mortalidad	Sí	60 (Hembras)	6 (Hembras)	No	36	>7200		
		120 (Machos)	12 (Machos)					
Toxicidad por dosis repetida (oral) perro								
Signos clínicos: ptialismo; temblores, conjuntiva roja, ataxia, hipomotilidad,			Sí	10-15	ND	No	36	ND
Signos del SNC: agresividad y movimientos sorprendentes			Sí	15	ND	No	36	ND
ND = No determinado, el índice de seguridad se calcula a partir de 10 mg/kg para Rimonabant y 0,005 para 3pMBP								

Ejemplo 8: Estudios de la farmacocinética, adsorción, distribución, metabolismo y excreción de 3pMBP5 **1. Farmacocinética y absorción de 3pMBP en animales****Materiales y métodos**

- 10 La farmacocinética (PK) de 3pMBP en plasma se estudió en ratones, ratas y perros, machos y hembras, después de administración *per os* (en aceite de maíz) por gavaje. La distribución de 3pMBP en el cerebro se estudió en ratones y ratas. En perros, también se administró 3pMBP por vía intravenosa después de la solubilización en ciclodextrina. Tanto en plasma como en cerebro, las concentraciones de 3pMBP se midieron mediante cromatografía líquida acoplada a una espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS).

Resultados

No hubo diferencias entre machos y hembras en los parámetros farmacocinéticos de 3pMBP en plasma después de la administración a ratones (0,3, 4 y 10 mg/kg, *per os*), ratas (1,6 mg/kg, *per os*) y perros (0,7 mg/kg, *per os* e *iv*). Como se describe en la Tabla 8 (se acumulan los resultados de animales machos y hembras), el aumento del ABC en plasma después de la administración única de 3pMBP fue lineal en las tres dosis estudiadas en ratones (0,3, 4 y 10 mg/kg). En ratones, ratas y perros, el $t_{m\acute{a}x}$ de 3pMBP fue similar (≈ 3 h), lo que sugiere una tasa de absorción comparable de 3pMBP. La semivida de 3pMBP fue la más larga en perros (28,0 h *per os*; 35,9 *iv*), seguido de ratones (17,8-18,3 h) y fue más corto en ratas (8-13,9 h). Las relaciones ABC/dosis después de la administración *per os* fue mayor en perros (2074), seguida de ratones (848-1132); la más bajo fue en ratas (661).

En ratones y ratas, 3pMBP tuvo una $t_{m\acute{a}x}$ más larga (7 h frente a ≈ 3 h) y mayores ABC y $C_{m\acute{a}x}$ en el cerebro que en el plasma. La relación cerebro/plasma de ABC y $C_{m\acute{a}x}$ parecía inversamente relacionada con la dosis, con las relaciones más altas ($C_{m\acute{a}x} = 2,8$ y $ABC = 7,38$) observadas para 0,3 mg/kg de 3pMBP en ratones. La semivida de 3pMBP en el cerebro y el plasma fue similar.

Después de la administración oral o intravenosa de 3pMBP, ratones, ratas y perros mostraron un perfil de eliminación bifásico, una disminución rápida (fase de distribución) seguida de una disminución mucho más gradual hasta el último momento de muestreo (fase de eliminación).

En perros, la biodisponibilidad de 3pMBP fue aproximadamente del 68 %.

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos medios resumidos en plasma de ratones, ratas y perros después de la administración única de 3pMBP

Especies	Dosis	Dosis mg/kg	n	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	ABC última (ng/ml*h)	Relación ABC/dosis	Relación ABC M/F	$T_{1/2}$ (h)
Ratones	<i>Per os</i>	0,3	6	35,5	2,5	254	848	1,1	17,8
		4	6	490	2,25	3744	936	1,5	18,3
		10	6	1787	2,25	11322	1132	0,9	18,2
Ratas		1,6	9	116,4	4,1	1058,7	661,7	0,7	13,9
Perros	<i>iv</i>	0,7	6	505	0,125	2192	3131	1,28	35,9*
	<i>per os</i>	0,7	6	137,7	2,67	1452,5	2074,5	0,93	28,0*

Los datos de machos y hembras estaban colapsados. Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC en negrita deben multiplicarse por 4 para compensar la dosis más baja realmente administrada.
 *= $t_{1/2}$ determinado mediante una técnica de regresión lineal manual eligiendo los últimos tres puntos de cada curva PK.

2. Farmacocinética de 3pMBP en seres humanos

Material y métodos

En este estudio, cohortes independientes de voluntarios sanos recibieron una única administración de 3pMBP en una de 3 dosis crecientes (0,2, 0,6; 2 mg/sujeto) o placebo. En cada cohorte de dosis utilizando un procedimiento con doble enmascaramiento, 6 sujetos recibieron la dosis asignada de 3pMBP y 2 sujetos recibieron placebo.

Las concentraciones plasmáticas de 3pMBP se evaluaron realizando una farmacocinética completa durante las primeras 24 horas después de la dosificación y cada 24 horas posteriormente.

Resultados

La administración oral de 3pMBP indujo concentraciones plasmáticas del fármaco que estaban en el intervalo predicho por los estudios farmacocinéticos en animales utilizando la conversión de la relación de superficie corporal, lo que confirma una buena absorción de 3pMBP en seres humanos. La dosis de 0,2 mg/sujeto indujo un aumento en las concentraciones plasmáticas de 3pMBP que están en el intervalo de las observadas en la DE₁₀₀ más observada (0,015 mg/kg) para la inhibición de los efectos conductuales del THC en roedores.

3. Metabolismo de 3pMBP

Materiales y métodos

Estabilidad metabólica de 3pMBP en microsomas de hígado de seres humanos, rata, ratón y perro:

La investigación se realizó sobre microsomas hepáticos (MH) procedentes de ratón (MHR), rata (MHRa), perro (MHP) y ser humano (MHH).

Se incubó 3pMBP con conjuntos de microsomas hepáticos suplementados con NADPH como cofactor. Se tomaron

muestras en 5 momentos diferentes (0, 10, 20, 30 y 60 minutos) y se monitoreó la desaparición del compuesto original en modo MRM usando LC/MS-MS. Se han determinado el aclaramiento intrínseco y la semivida. Se utilizó verapamilo como compuesto de referencia.

5 *Perfil metabólico de [3H]-3pMBP en plasma y excrementos en la rata*

El perfil metabólico se evaluó en plasma, en orinas y heces y los metabolitos radiomarcados se identificaron mediante su tiempo de retención mediante análisis por Radio-HPLC. Los resultados se expresan como el % de la suma de todas las áreas de picos detectados.

10

Conversión de 3pMBP en esteroides posteriores en ratones, ratas, perros y seres humanos:

La conversión de 3pMBP en esteroides posteriores se estudió en ratones, midiendo esteroides posteriores de pregnenolona progesterona y 17 α ,OH pregnenolona, que son las dos primeras etapas del metabolismo de la pregnenolona. La conversión de 3pMBP en esteroides posteriores también se estudió en ratas y perros después de la administración de 2, 9 y 36 mg/kg del compuesto midiendo la testosterona, DHEA y alopregnanolona. Finalmente, la conversión en esteroides posteriores (DHEA, alopregnanolona y testosterona) se estudió en seres humanos después de la administración aguda de una de tres dosis (0,2, 0,6 y 2 mg/sujeto) de 3pMBP. En todos estos estudios, las concentraciones plasmáticas de esteroides se midieron mediante cromatografía de masas en tándem con cromatografía de gases (GC/MS-MS).

20

Resultados

Estabilidad metabólica en microsomas hepáticos (MH)

25

3pMBP tuvo un aclaramiento bajo en MH humanos y de rata (aclaramiento intrínseco = 3,38 y 12,3 μ l/min/mg; semivida = 410 y 113 min, respectivamente) y un aclaramiento moderado en MH de perros y ratones (aclaramiento intrínseco = 26,0 y 29,7 μ l/min/mg y semivida = 53,4 y 46,6 min, respectivamente).

30

Perfil metabólico en la rata

In vivo, [3H]-3pMBP no produce ningún metabolito importante en plasma. El compuesto se excreta predominantemente a través de las heces, donde parece ocurrir la mayor parte del metabolismo. En el plasma a las tres y seis horas después de la administración oral de [3H]3pMBP, sólo se observó un pico importante, correspondiente a 3pMBP, que representaba respectivamente el 100 % (3 h) y el 78 % (6 h) de todos los picos integrados. A las 24 horas, 3pMBP no estaba presente en el plasma y solo había trazas de un metabolito. En la orina, se detectó poca 3pMBP (menos de una dosis del 0,5 %) en cada intervalo de tiempo. En el intervalo de 0-6 horas, se detectaron tres picos principales ($\approx$ 30 % cada uno), incluido el correspondiente a 3pMBP. A las 6-24 h y a las 24-48 h no se detectó 3pMBP en la orina y solo estaban presentes los otros dos picos. La mayor parte de la dosis excretada se encontró en las heces en las que, además de 3pMBP, se encontraron otros siete picos que representaban cada uno entre el 30 y el 10 % de los picos integrados.

40

Conversión de 3pMBP en esteroides posteriores

La administración de 3pMBP a 0,3 y 10 mg/kg *per os* no aumentó las concentraciones plasmáticas de progesterona y 17-OH-pregnenolona, las dos primeras etapas del metabolismo de la pregnenolona, medido en ratones macho y hembra 2, 5, 8 o 24 horas después de la administración de 3pMBP. De forma similar, en ratas y perros machos y hembras no hubo efecto de la administración aguda o repetida (28 días) de 3pMBP (2, 9 y 36 mg/kg) sobre las concentraciones plasmáticas de testosterona, DHEA y alopregnanolona, medidas en la predosis y luego 1 h, 2 h, 4 h, 8 h y 24 h después de la dosis. Finalmente, no se observaron cambios en los esteroides activos en seres humanos para todas las dosis de 3pMBP probadas.

50

4. Interacción de 3pMBP con enzima metabólica CYP, UGT y transportadores celulares

55

Material y métodos

Se probó *in vitro* la inhibición potencial por 3pMBP de la actividad de varias isoenzimas CYP (1A, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A) utilizando microsomas hepáticos humanos.

60

Se preincubó 3pMBP a una concentración única (10 μ M) con sustrato y microsomas hepáticos humanos combinados. La reacción se inició añadiendo compuestos generadores de NADPH y después de detener la reacción y el tratamiento de las muestras, se utilizó la detección por HPLC-UV/VIS y HPLC-MS/MS para la detección de áreas pico correspondientes al metabolito de cada sustrato.

65

Se probó 3pMBP (10 μ M) en el ensayo de inhibición de UGT1A1 (sustrato de escopoletina recombinante). 3pMBP se preincubó con UGT1A1 y el sustrato fluorescente escopoletina en tampón Tris (pH 7,5) durante 15 minutos a 37°C. La

reacción se inicia añadiendo el cofactor ácido uridina-difosfoglucurónico (UDPGA), la incubación continúa durante 60 minutos y se mide la intensidad relativa de fluorescencia (IRF) en un lector de placas fluorescentes.

Se probó el potencial del compuesto de prueba 3pMBP para inducir CYP1A2, CYP2B6 y CYP3A4 *in vitro* por triplicado en concentraciones de prueba de 0,01, 0,1 y 1 μ M utilizando el nivel de ARNm como criterio de valoración.

Se probó *in vitro* la inhibición por 3pMBP de la actividad de diferentes transportadores celulares (OCT2, BCRP, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, P-gp).

Los efectos de 3pMBP (10 μ M), y de los inhibidores de referencia de cada transportador, se estudiaron en líneas celulares sobre la expresión de los transportadores celulares diana. Se utilizaron ovarios de hámster chino (CHO) para todos los transportadores excepto para P-gp que se estudió en células de riñón canino Madin-Darby (MDR1-MDCKII). La inhibición de la actividad de cada transportador se evalúa midiendo cambios en el transporte de sus sustratos específicos mediante fluorometría.

Resultados

3pMBP a 10 μ M no indujo una inhibición significativa de la actividad de las isoenzimas CYP (1A, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A) y a 10 nM, 100 nM y 1 μ M no aumentó la expresión de CYP1A2, CYP2B6 y CYP3A4.

Siguiendo las directrices de la FDA, 3pMBP podría etiquetarse como un fármaco que no interactúa con las enzimas CYP.

Además, 3pMBP (10 μ M) no modificó la actividad de UGT1A1 y de varios transportadores celulares (OCT2, BCRP, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, P-gp).

Conclusión

En general, 3pMBP muestra características favorables de adsorción/distribución/metabolismo/excreción que no difieren entre machos y hembras y que son similares entre ratones, ratas, perros y seres humanos con la excepción de una semivida más larga y un ABC más alto en perros y seres humanos que en las otras dos especies. 3pLa MBP también tiene una buena biodisponibilidad (68 % en perros).

3pMBP muestra un ABC cuatro veces mayor en el cerebro que en el plasma.

3pMBP también es metabólicamente estable. No se convierte en esteroides posteriores en ratones, ratas, perros y seres humanos. Muestra la más alta estabilidad *in vitro* en microsomas hepáticos y hepatocitos en seres humanos en comparación con otras especies. En la rata, *in vivo*, 3pMBP no produce ningún metabolito por encima de los niveles traza en el plasma y la mayor parte del compuesto se excreta como tal a través de las heces.

Finalmente, 3pMBP no inhibe la actividad de las principales isoenzimas humanas CYP, UGT y transportadores celulares, ni induce la expresión de isoenzimas CYP.

Adams AJ, Banister SD, Irizarry L, Trecki J, Schwartz M, Gerona R, "Zombie" Outbreak Caused by the Synthetic Cannabinoid AMB-FUBINACA in New York. *N. Engl. J. Med.* 19 de ene de 2017;376(3):235-242

Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P *et al.* Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat. Neurosci.* 2010. 13, 281-283.

Bellocchio L, Soria-Gómez E, Quarta C, Metna-Laurent M, Cardinal P, Binder E, *et al.* Activation of the sympathetic nervous system mediates hypophagic and anxiety-like effects of CB1 receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 19 de marzo de 2013;110(12):4786-91.

Bermúdez-Silva FJ, Cardinal P, Cota D. The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *J. Psychopharmacol.* Enero de 2012;26(1):114-24.

Bond y Lader, *Br. J. Med. Psychol.* 1974; 47:211-218

Busquets-García A, Soria-Gómez E, Redón B, Mackenbach Y, Vallée M, Chaouloff F, Varilh M, Ferreira G, Piazza PV, Marsicano G. Pregnenolone blocks cannabinoid-induced acute psychotic-like states in mice, noviembre de 2017;22(11):1594-1603

Cayrou S., Dickès P. y Dolbeault S. Profile Of Mood States (POMS-f) *Journal de Thérapie Comportementale et Cognitive*, 2003, 13(2), 83-88.

Cayrou S., Dickès P., Gauvain-Piquard A., Dolbeault S., Callahan S. y Roge B. Validation de la traduction française

du POMS (Profile Of Mood States). *Psychologie et Psychométrie*, 2000, 21(4), 5-22.

Cerdá M, Wall M, Keyes K.M, Galea S, y Hasin D. Medical marijuana laws in 50 states: investigating the relationship between state legalization of medical marijuana and marijuana use, abuse and dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2012; 120, 22-27;

Cook SA, Lowe JA, Martin BR. CB1 receptor antagonist precipitates withdrawal in mice exposed to Delta9-tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* junio de 1998;285(3):1150-6. Cutando L, Busquets-García A, Puighermanal E, Gomis-González M, Delgado-García JM, Gruart A, Maldonado R, Ozaita A. Microglial activation underlies cerebellar deficits produced by repeated cannabis exposure. *J. Clin. Invest.* Julio de 2013;123(7):2816-31.

D'Souza DC. Cannabinoids and psychosis. *Int. Rev. Neurobiol.* 2007 78:289-326.

DSM-V Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5ª Edición. 2013 Washington DC, EE. UU.: American Psychiatric Press.

Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav. Brain. Res.* 31 de Diciembre de 2010;215(2):244-54

Galli J.A., Sawaya R.A., Friedenberg F.K. Cannabinoid hyperemesis syndrome. *Current Drug Abuse Reviews.* 2011;4(4):241-249

EPAR (EMA) discussion: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000666/WC500021284.pdf

George O, Vallée M, Vitiello S, Le Moal M, Piazza PV, Mayo W. Low brain allopregnanolone levels mediate flattened circadian activity associated with memory impairments in aged rats. *Biol. Psychiatry.* 15 de noviembre de 2010;68(10):956-63

Hall W, y Degenhardt L. Adverse health effects of non-medical cannabis use. *Lancet* 2009 374, 1383-1391.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* junio de 2002;54(2): 161-202.

Huang P, Liu-Chen LY, Unterwald EM, Cowan A. Hyperlocomotion and paw tremors are two highly quantifiable signs of SR141716-precipitated withdrawal from delta9-tetrahydrocannabinol in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett.* 6 de noviembre de 2009; 465(1): 66-70.

Hutcheson DM, Tzavara ET, Smadja C, Valjent E, Roques BP, Hanoune J, Maldonado R. Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Br. J. Pharmacol.* diciembre de 1998;125(7):1567-77.

International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by Human pharmaceuticals S7B. Revised Step.

Khan M, Pace L, Truong A, Gordon M, Moukaddam N, Catatonia secondary to synthetic cannabinoid use in two patients with no previous psychosis *Am. J. Addict.*, 25 (1) (2016), pág. 25-27

Kedzior KK, Martín-Iverson MT. Chronic cannabis use is associated with attention-modulated reduction in prepulse inhibition of the startle reflex in healthy humans. *J. Psychopharmacol.* 2006. 20: 471-84.

Kirkham TC. Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight. *Behav. Pharmacol.* 2005;16: 297-313.

Lafaye G, Karila L, Blecha L, Benyamina A, Cannabis, cannabinoids, and health., *Dialogues Clin. Neurosci.* septiembre de 2017; 19(3): 309-316.

Leggio GM, Cathala A, Neny M, Rouge-Pont F, Drago F, Piazza PV, Spampinato U. In vivo evidence that constitutive activity of serotonin2C receptors in the medial prefrontal cortex participates in the control of dopamine release in the rat nucleus accumbens: differential effects of inverse agonist versus antagonist. *J. Neurochem.* octubre de 2009;111(2):614-23

Lichtman AH, Fisher J, Martin BR. Precipitated cannabinoid withdrawal is reversed by Delta(9)-

tetrahydrocannabinol or clonidine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* mayo-junio 2001;69(1-2): 181-8.

Malinen H, Hyytiä P. Ethanol self-administration is regulated by CB1 receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in alcohol-preferring AA rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* nov de 2008; 32(11):1976-83.

Martin WR, Sloan JW, Sapira JD y Jasinski DR. Physiologic, subjective, and behavioral effects of amphetamine, methamphetamine, ephedrine, phenmetrazine, and methylphenidate in man. *Clin. Pharm. Ther.* 1971 12: 245-258, 1971.

Mazier W, Saucisse N, Gatta-Cherifi B, Cota D. The endocannabinoid system as pivotal orchestrator of obesity and metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab.* Octubre de 2015;26(10):524-37.

McNair DM, Lorr M, Droppleman LF. Edits manual for the profile of mood states. San Diego, California: Educational and industrial testing service, 1992.

Moreira FA, Grieb M, Lutz B. Central side-effects of therapies based on CB1 cannabinoid receptor agonists and antagonists: focus on anxiety and depression. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* febrero de 2009;23 (1):133-44.

Nagai H, Egashira N, Sano K, Ogata A, Mizuki A, Mishima K *et al.* Antipsychotics improve Delta9-tetrahydrocannabinol-induced impairment of the prepulse inhibition of the startle reflex in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006. 84: 330-6.

Patel S y Hillard CJ. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* julio de 2006;318(1):304-11.

Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*. Enero de 2005;177(3):245-55.

Pratt J, Winchester C, Dawson N, Morris B Advancing schizophrenia drug discovery: optimizing rodent models to bridge the translational gap. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 22 de junio de 2012;11(7):560-79.

Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, Le Fur G. Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* agosto de 1996;278(2):871-8.

S7A Safety Pharmacology Studies For Human Pharmaceuticals ICH July 2001 Sanchis-Segura C y Spanagel R. Behavioural Assessment of Drug Reinforcement and Addictive Features in Rodents: an Overview. *Addict. Biol.* 2006. 11:2-38.

Shore DM, Baillie GL, Hurst DH, Navas F, Seltzman HH, Marcos JP, *et al.* Allosteric modulation of a cannabinoid G protein-coupled receptor: binding site elucidation and relationship to G protein signaling. *J. Biol. Chem.* febrero de 2014;289(9):5828-45.

Steiner MA, Marsicano G, Nestler EJ, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT. Antidepressant-like behavioral effects of impaired cannabinoid receptor type 1 signaling coincide with exaggerated corticosterone secretion in mice. *Psychoneuroendocrinology*. enero de 2008;33(1): 54-67.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (2013). Results from the 2013 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings";

Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Center for Behavioral Health Statistics and Quality. El Informe DAWN: Highlights of the 2011 Drug Abuse Warning Network (DAWN) Findings on Drug-Related Emergency Department Visits. Rockville, MD: 22 de febrero de 2013

Tzavara ET, Davis RJ, Perry KW, Li X., Salhoff C, Bymaster FP, Witkin JM, Nomikos GG. The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions. *Br. J. Pharmacol.* febrero de 2003;138 (4):544-53.

Vallée M, Rivera JD, Koob GF, Purdy RH, Fitzgerald RL. Quantification of neurosteroids in rat plasma and brain following swim stress and allopregnanolone administration using negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1 de diciembre de 2000;287(1):153-66.

Vallée M, Vitiello S, Bellocchio L, Hébert-Chatelain E, Monlezun S, Martin-Garcia E, *et al.* Pregnenolone can protect the brain from cannabis intoxication. *Science.* 3 de ene de 2014;343(6166):94-8.

Volkow N.D, Baler R.D, Compton W.M, y Weiss S.R.B. Adverse health effects of marijuana use. *N. Engl. J. Med.* 2014 370, 2219-2227;

5 Walf AA y Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2007; 2(2):322-8.

Wiley JL, Burston JJ, Leggett DC, Alekseeva OO, Razdan RK, Mahadevan A, Martin BR. CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br. J. Pharmacol.* junio 2005; 145(3):293-300.

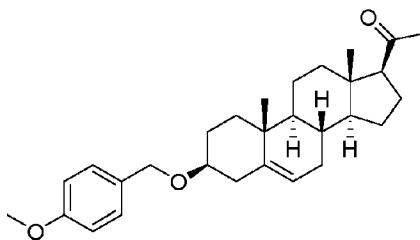
10 Wiley JL, Evans RL, Grainger DB, Nicholson KL. Age-dependent differences in sensitivity and sensitization to cannabinoids and 'club drugs' in male adolescent and adult rats. *Addict. Biol.* 2008. 13, 277-86.

15 Wilson CA, Koenig JI. Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2014;24:759-773.

World Health Organization, The Health and Social Effects of Nonmedical Cannabis Use, 2016

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula (I):



Fórmula (I)

para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con los cannabinoides.

2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el trastorno relacionado con los cannabinoides se selecciona entre el trastorno por consumo de cannabinoides; intoxicación por cannabinoides; abstinencia de cannabinoides; otros trastornos inducidos por los cannabinoides; trastorno relacionado con los cannabinoides no especificado; síndrome de hiperemesis por cannabinoides; catatonia inducida por cannabinoides.

3. El compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en donde el trastorno relacionado con los cannabinoides es un trastorno por consumo de cannabinoides.

4. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el trastorno relacionado con los cannabinoides es una intoxicación por cannabinoides.

5. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el trastorno relacionado con los cannabinoides es una abstinencia de cannabinoides.

6. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el trastorno relacionado con los cannabinoides es otro trastorno inducido por los cannabinoides seleccionado entre el trastorno de ansiedad inducido por cannabinoides, trastorno psicótico inducido por cannabinoides, trastorno del sueño inducido por cannabinoides, delirio por intoxicación por cannabinoides.

7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el trastorno relacionado con los cannabinoides es un trastorno relacionado con los cannabinoides no especificado.

8. El compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el trastorno relacionado con los cannabinoides es un síndrome de hiperemesis por cannabinoides.

9. El compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el trastorno relacionado con los cannabinoides es una catatonia inducida por cannabinoides.

10. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los cannabinoides proceden de la planta *Cannabis* L.

11. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los cannabinoides son compuestos sintéticos con actividad agonista de CB1.

12. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto se administra a un sujeto por vía oral.

13. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto se administra a un sujeto por vía parenteral, ya sea con una formulación fácilmente absorbible o de depósito.

14. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto se administra a un sujeto por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular.

15. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto se administra por vía intranasal o por inhalación o por vía sublingual o tópica o transdérmica o en forma de supositorio o pesario.

16. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto se administra a un sujeto en una dosis comprendida entre 1 μ g y 1000 mg.

- 5 17. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho compuesto se administra en un vehículo oleaginoso, tal como un aceite vegetal con triglicéridos de cadena larga y preferentemente aceite de maíz.

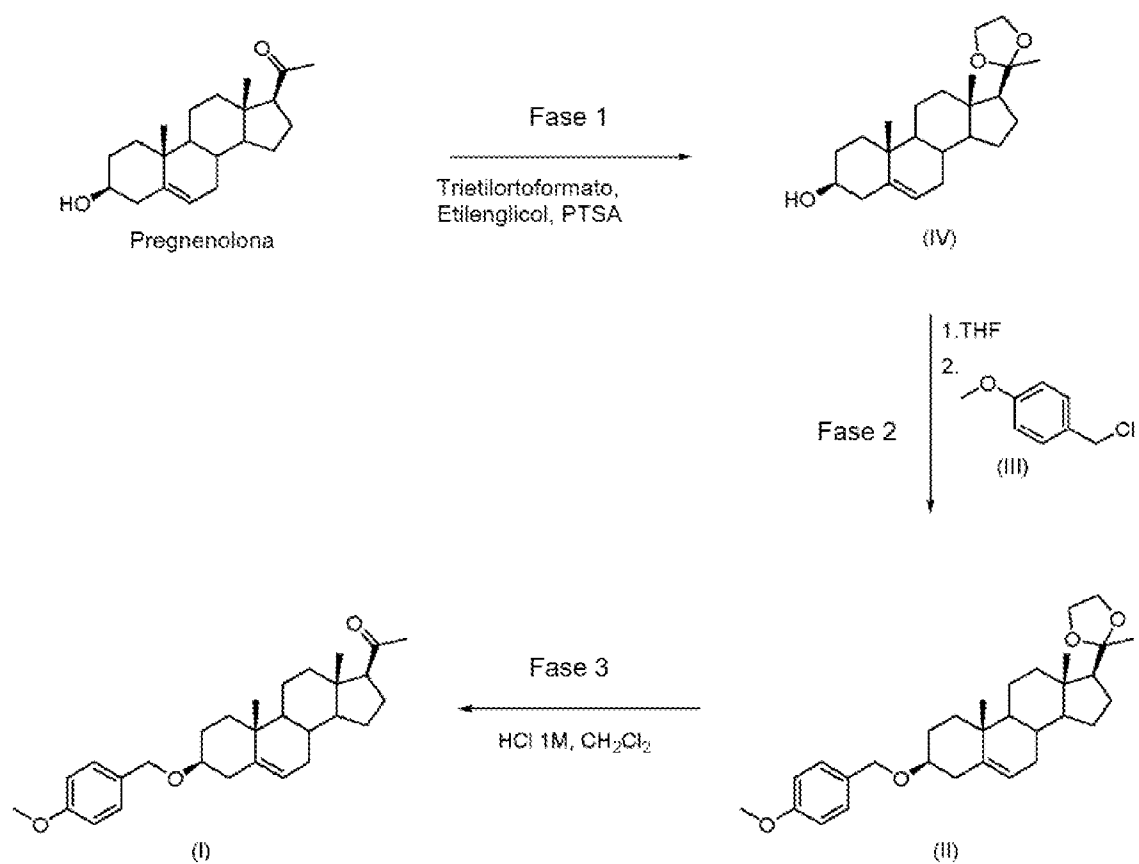


Figura 1

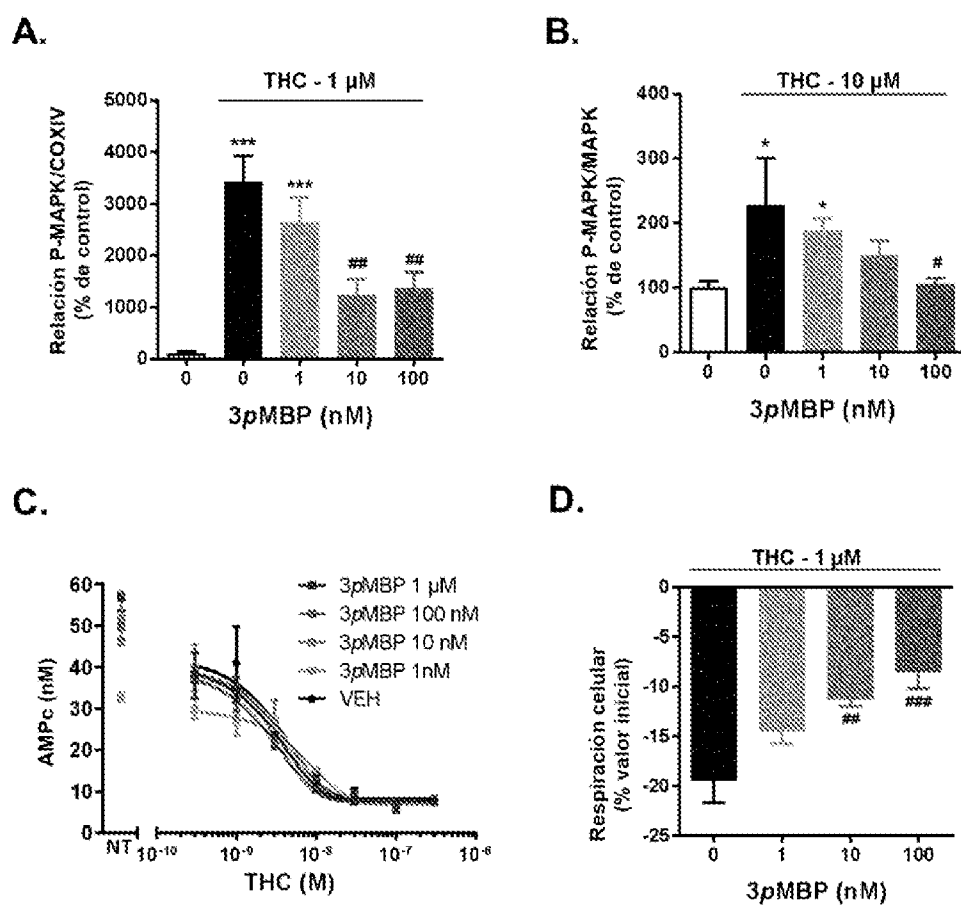


Figura 2

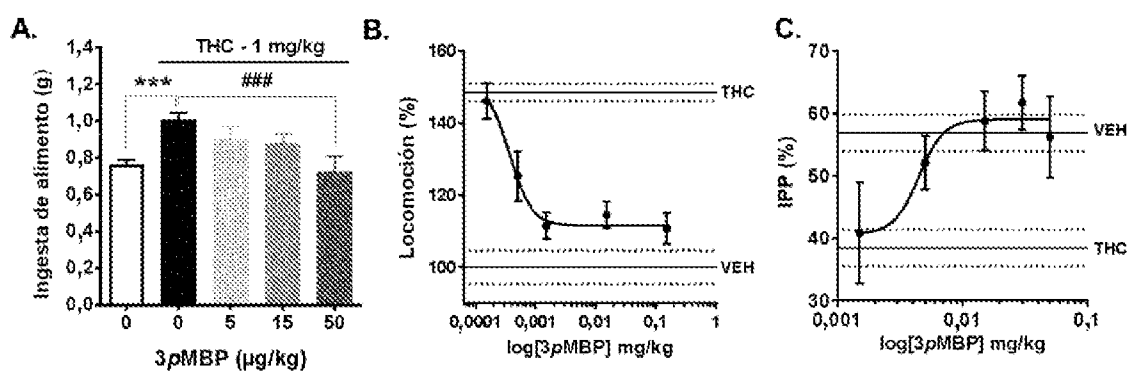


Figura 3

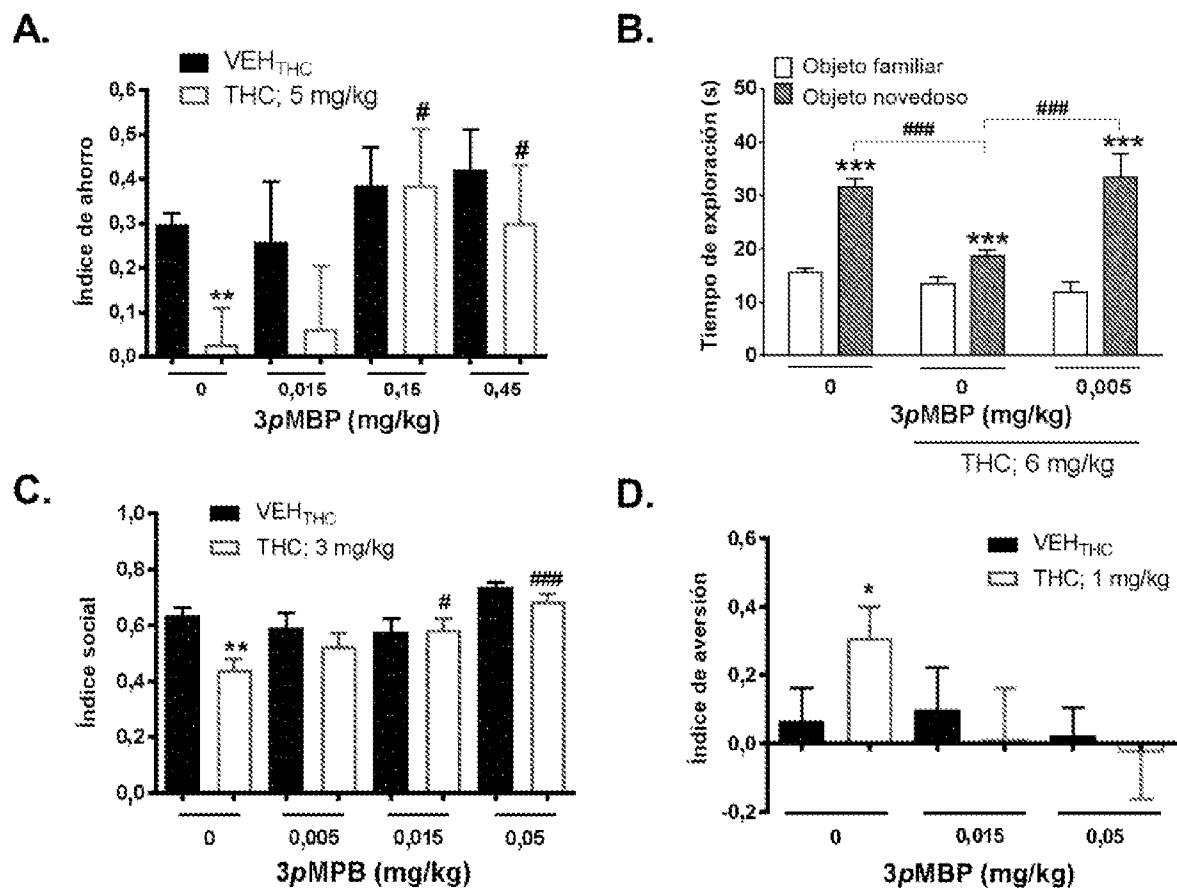


Figura 4

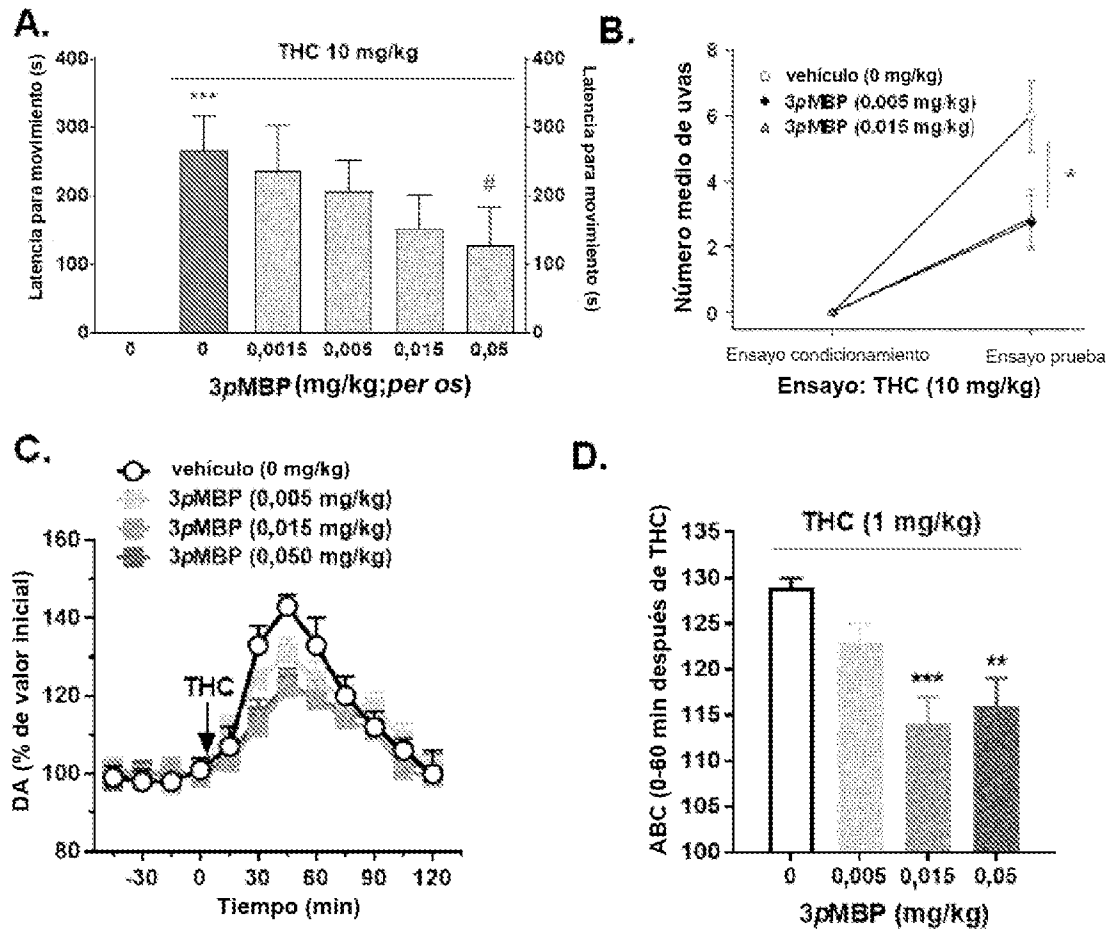


Figura 5

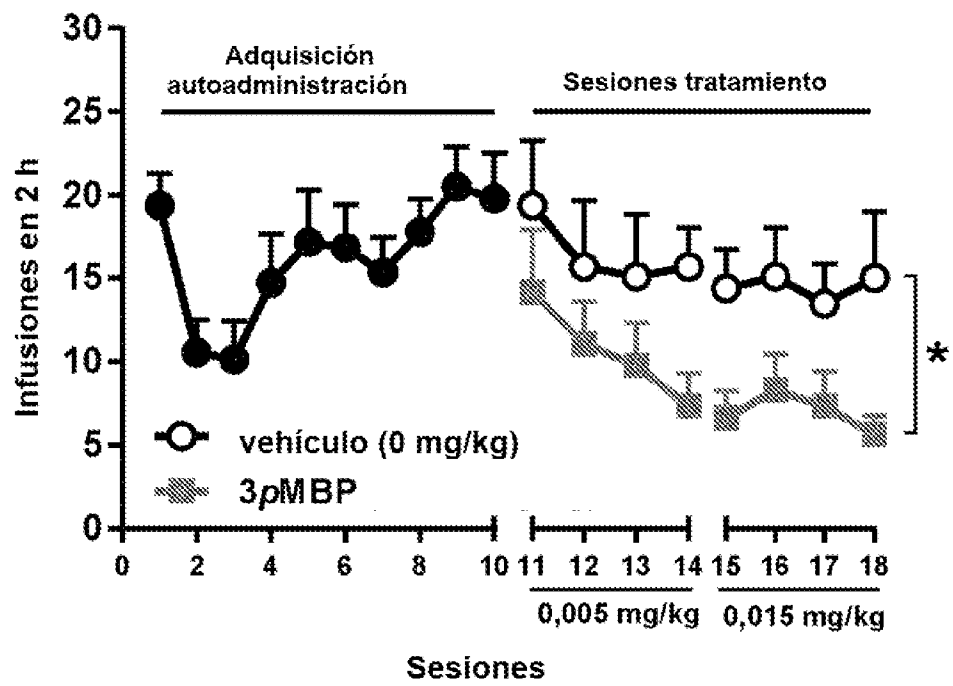


Figura 6

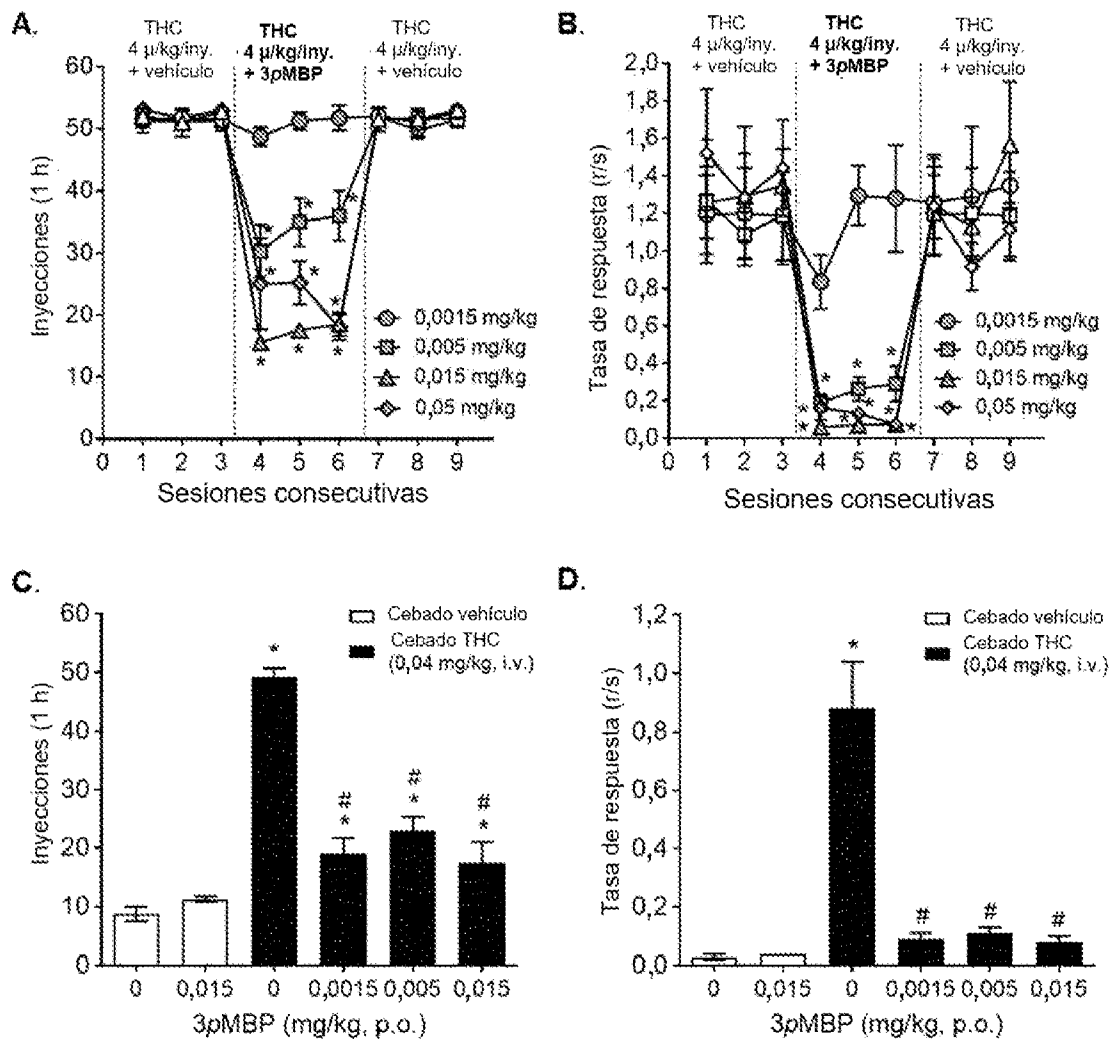


Figura 7

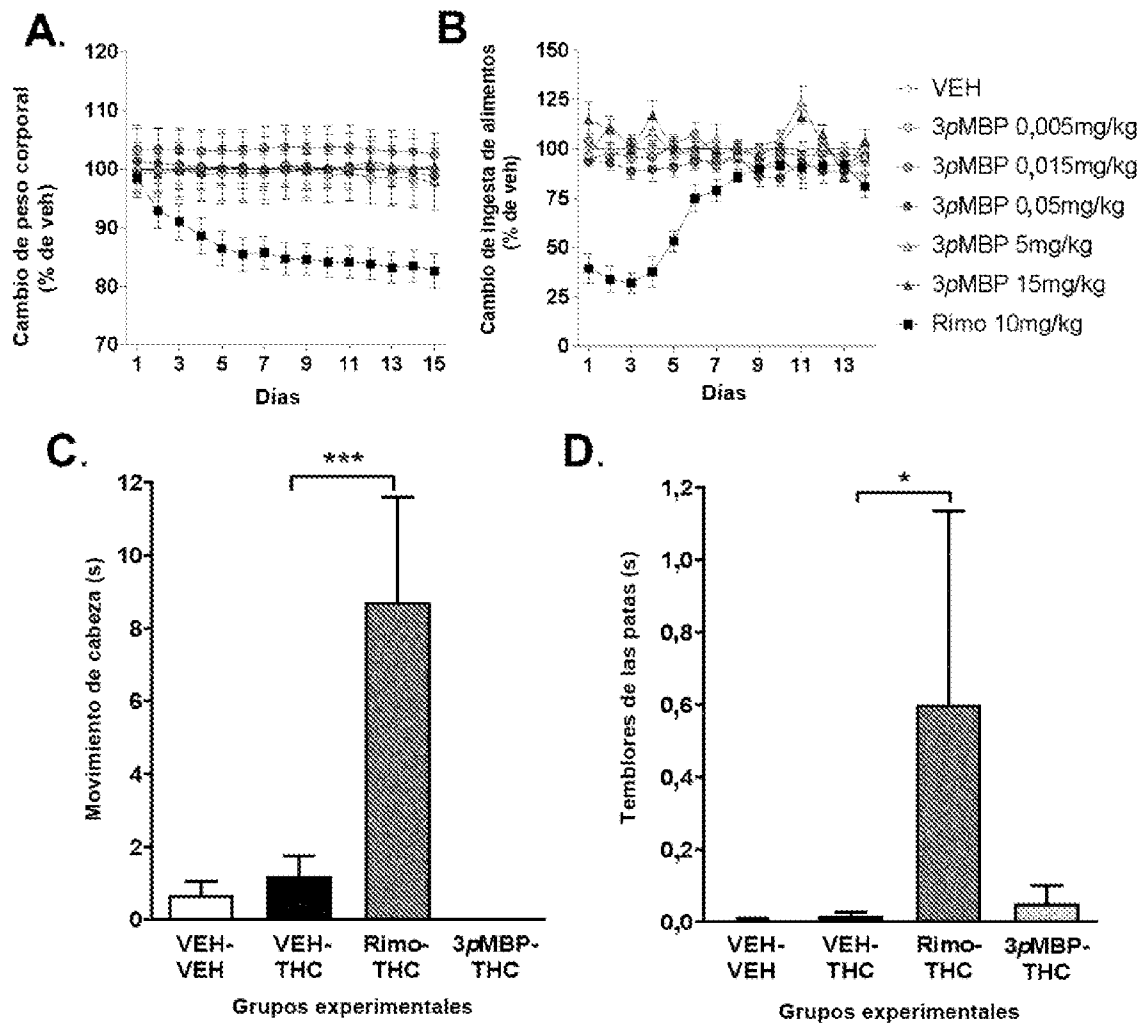


Figura 8

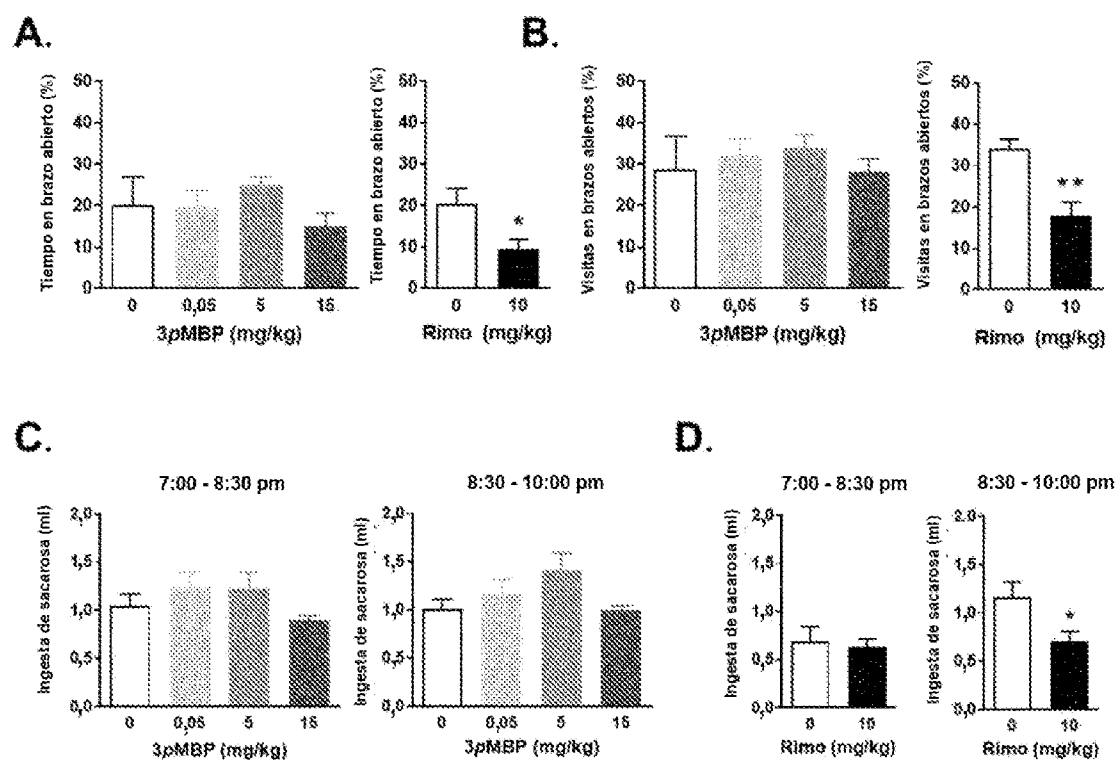


Figura 9

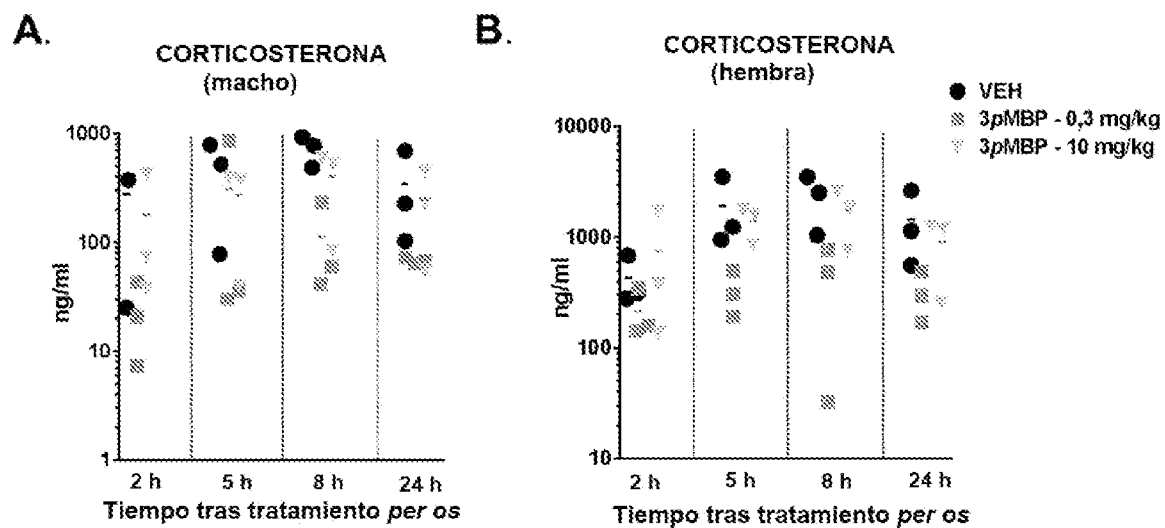


Figura 10