

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 998**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/12** (2006.01)

**A61K 38/07** (2006.01)

**A61P 25/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2015 PCT/US2015/040184**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16007956**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2015 E 15818825 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3166625**

54 Título: **Estereoisómeros de tetrapéptido cíclico**

30 Prioridad:

**11.07.2014 US 201462023392 P**

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

**28.01.2020**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF KANSAS (100.0%)  
245 Strong Hall, 1450 Jayhawk Boulevard  
Lawrence, KS 66045, US**

72 Inventor/es:

**ALDRICH, JANE V. y  
SENADEHEERA, S P SANJEEWA NILENDRA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 738 998 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

Estereoisómeros de tetrapéptido cíclico

5 **Referencia cruzada a solicitud relacionada**

La solicitud reivindica el beneficio de y la prioridad con respecto a la solicitud provisional estadounidense de n.º de serie 62/023.392 presentada el 11 de julio de 2014.

10 **Antecedentes**

Los receptores opioides son un grupo de receptores acoplados a proteínas G inhibidores con opioides como ligandos. Los receptores opioides se distribuyen ampliamente en el cerebro y se encuentran en la médula espinal y el tubo digestivo. Los tipos de receptores opioides son mu ( $\mu$ ) MOR, kappa ( $\kappa$ ) KOR y delta ( $\delta$ ) DOR. Los receptores generalmente se nombraron usando la primera letra del primer ligando que se encontró para unirlos a los mismos. Por ejemplo, la morfina fue la primera sustancia química mostrada para unir a receptores mu. La primera letra de la droga morfina es m, representada como la letra griega correspondiente  $\mu$ . De manera similar, se mostró por primera vez que una droga conocida como ketociclazocina interactúa con los receptores kappa, mientras que el receptor delta se nombró por el tejido de los conductos deferentes del ratón en el que se caracterizó por primera vez el receptor. El receptor mu es la diana principal de los analgésicos narcóticos utilizados actualmente.

Los tipos de receptores opioides son idénticos al ~70% con diferencias sustanciales ubicadas en extremos N- y C-terminales, así como en otras regiones de los receptores. Se cree que la proteína G se une al tercer bucle intracelular de los receptores opioides. Tanto en ratones como en humanos, los genes de los diversos subtipos de receptor se ubican en diferentes cromosomas.

A continuación, se presentan algunas características del MOR, KOR y DOR.

El receptor opioide mu ( $\mu$ ) (MOR) se encuentra en el cerebro (por ejemplo, en la corteza (láminas III y IV), tálamo, estriomas, sustancia gris periacueductal y bulbo rostral ventromedial), en la médula espinal (por ejemplo, en la sustancia gelatinosa), en las neuronas sensoriales periféricas y en el tubo intestinal. El receptor mu tiene funciones en analgesia, dependencia física, depresión respiratoria, miosis, euforia, motilidad gastrointestinal reducida, dependencia física y posible vasodilatación.

El receptor opioide kappa ( $\kappa$ ) (KOR) se encuentra en el cerebro (por ejemplo, en el hipotálamo, sustancia gris periacueductal y claustró), en la médula espinal (por ejemplo, en la sustancia gelatinosa) y en las neuronas sensoriales periféricas. Los receptores opioides Kappa tienen funciones en la analgesia, los efectos anticonvulsivos, la depresión, los efectos disociativos/alucinógenos, la diuresis, la disforia, la miosis, la neuroprotección, la sedación y el estrés.

El receptor opioide delta ( $\delta$ ) (DOR) se encuentra en el cerebro (por ejemplo, en los núcleos protuberanciales, amígdala, bulbos olfativos, corteza profunda) y en las neuronas sensoriales periféricas. Los receptores opioides delta tienen funciones en la analgesia, los efectos antidepresivos, los efectos convulsivos, la dependencia física, y pueden modular la depresión respiratoria mediada por receptores opioides  $\mu$ .

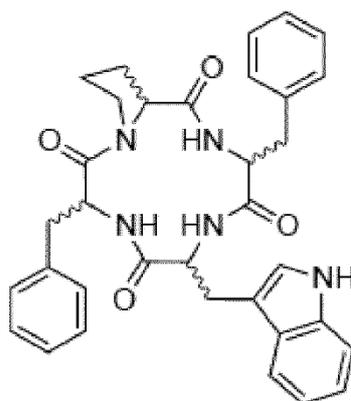
El péptido macrocíclico CJ-15,208 (ciclo [Phe-D-Pro-Phe-Trp]) se conoce bien en la técnica, presenta actividad antagonista de receptor opioide kappa (KOR)/agonista opioideo mixta *in vivo* y es un compuesto de partida prometedor para desarrollar terapias novedosas para el tratamiento del dolor y el abuso de drogas, véase, por ejemplo, los documentos WO 2010/006267 A2, US 5.885.959 A, Eans *et al.* *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 2013, vol. 169, págs. 426-436; Aldrich *et al.* *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 2014, vol. 171, págs. 3212-3222; y Dolle *et al.* *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*, 2009, vol. 19, págs. 3647-3650. Se sintetizaron análogos de este péptido de partida para explorar la influencia de los restos aromáticos en los perfiles de actividad opioide de análogos.

55 **Sumario**

La presente invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que está fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente como información. Se dan a conocer en el presente documento compuestos tetrapéptidos cíclicos, composiciones farmacéuticas y métodos de uso de tales composiciones farmacéuticas. Los compuestos tetrapéptidos cíclicos y las composiciones farmacéuticas dados a conocer en el presente documento son analgésicos potentes activos en varios modelos de dolor con, en algunos casos, tolerancia disminuida y probabilidad reducida de inducir adicción en relación con otros opiáceos conocidos.

En una realización, se da a conocer un tetrapéptido cíclico que tiene una secuencia de ciclo [Phe-Pro-Phe-Trp] que tiene una estructura de fórmula 1 o un derivado de la misma.

65



Fórmula 1

En la estructura ilustrada de fórmula 1, las líneas onduladas en las cadenas laterales de aminoácidos indican la existencia de un estereocentro indefinido. Cada uno de estos estereocentros de aminoácidos puede definirse como "D" o "L" utilizando la notación estándar para aminoácidos. Por consiguiente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 puede tener una configuración de aminoácidos de una de LDDL, DDLL, DDDL, DDL, LDDD, LLLL, DDDD, LLDL, DLLL, DLDL, LLLD, LLDD, DLDD o DLLD. Un tetrapéptido cíclico que tiene una configuración de aminoácidos de LDLL está específicamente excluido de las reivindicaciones en el presente documento. El tetrapéptido cíclico CJ-15,208 que se produce de manera natural tiene la configuración de aminoácidos de LDLL.

Preferiblemente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD, DDL o DDDD. Más preferiblemente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD o DDDD. Lo más preferiblemente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 tiene una configuración de aminoácidos de DDDL o DDDD.

En otra realización, se da a conocer una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, y una cantidad terapéuticamente eficaz del tetrapéptido cíclico de fórmula 1 que tiene una configuración de aminoácidos de una de LDDL, DDLL, DDDL, DDL, LDDD, LLLL, DDDD, LLDL, DLLL, DLDL, LLLD, LLDD, DLDD o DLLD. Preferiblemente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD, DDL o DDDD. Más preferiblemente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD o DDDD. Lo más preferiblemente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 tiene una configuración de aminoácidos de DDDL o DDDD.

En otra realización, se da a conocer un método para tratar dolor. El método incluye administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene un tetrapéptido cíclico de fórmula 1 que tiene una configuración de aminoácidos de una de LDDL, DDLL, DDDL, DDL, LDDD, LLLL, DDDD, LLDL, DLLL, DLDL, LLLD, LLDD, DLDD o DLLD. Preferiblemente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD, DDL o DDDD. Más preferiblemente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD o DDDD. Lo más preferiblemente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 tiene una configuración de aminoácidos de DDDL o DDDD.

Estos y otros objetos y características de la presente invención se harán evidentes de manera más completa a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas, o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención como se establece en adelante en el presente documento.

### Breve descripción de los dibujos

Para aclarar más las ventajas y características anteriores y otras de la presente invención, se hará una descripción más particular de la invención haciendo referencia a las realizaciones específicas de la misma, que se ilustran en los dibujos adjuntos. Se aprecia que estos dibujos representan sólo las realizaciones ilustradas de la invención. La invención se describirá y explicará con especificidad adicional y detalle a través del uso de los dibujos adjuntos en los que:

la figura 1 ilustra un efecto analgésico de un tetrapéptido cíclico en un ensayo de formol;

la figura 2 ilustra un efecto analgésico de un tetrapéptido cíclico en un ensayo de estiramiento de ácido acético;

la figura 3A-3B ilustra un efecto analgésico de los tetrapéptidos cíclicos en un ensayo de constricción nerviosa;

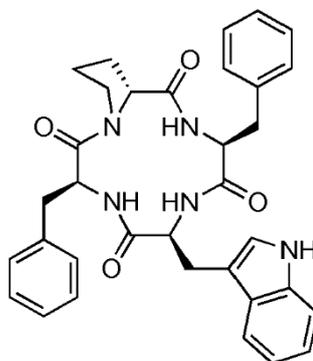
la figura 4 ilustra que la administración de los tetrapéptidos cíclicos no induce al comportamiento de búsqueda de droga;

la figura 5 ilustra que la administración de tetrapéptidos cíclicos seleccionados previene la reincorporación inducida por estrés del comportamiento de búsqueda de cocaína.

## 5 Descripción detallada

Se dan a conocer en el presente documento compuestos de tetrapéptidos cíclicos, composiciones farmacéuticas y métodos de uso de tales composiciones farmacéuticas. Los compuestos de tetrapéptidos cíclicos y las composiciones farmacéuticas que se dan a conocer en el presente documento son analgésicos potentes activos en varios modelos de dolor con tolerancia generalmente disminuida y probabilidad reducida de inducir adicción en relación con otros opiáceos conocidos.

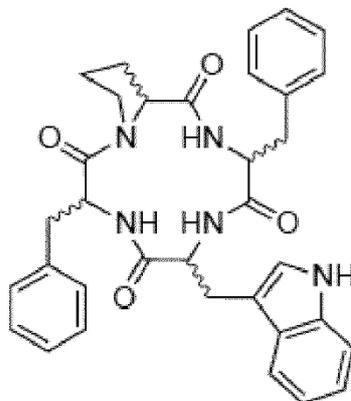
Recientemente, se ha demostrado que un tetrapéptido cíclico, CJ-15,208 y que tiene la fórmula 1, puede interactuar con receptores opioides (patente estadounidense 5,885,959). El CJ-15,208 (es decir, ciclo [Phe-D-Pro-Phe-Trp]) parece ser el producto natural (véase Ross et al., Tetraedron Letters, 2010, 51, 5020-5023). La interacción se indicó para proporcionar actividad analgésica, que puede atribuirse a ser un agonista, y proporcionar actividad de desintoxicación, que puede atribuirse a ser un antagonista. En consecuencia, la verdadera funcionalidad de CJ-15,208 no se caracterizó adecuadamente. Actualmente se ha encontrado que CJ-15,208 tiene actividades antagonista y agonista débiles en los receptores opioides kappa (KOR) *in vivo*. La estructura de CJ-15,208 se muestra a continuación.



CJ-15,208 (ciclo [Phe-D-Pro-Phe-Trp])

Actualmente se ha encontrado que los tetrapéptidos cíclicos que son isómeros estereoquímicos de CJ-15,208 pueden tener una actividad agonista superior de receptor opioide (es decir, actividad que alivia el dolor), y por lo tanto pueden ser útiles como analgésicos para tratar dolor inflamatorio y neuropático. Se ha encontrado además que los tetrapéptidos cíclicos seleccionados que se dan a conocer en el presente documento muestran una tolerancia disminuida y una probabilidad reducida de inducir adicción en relación con otros opiáceos conocidos.

Los tetrapéptidos cíclicos comentados en el presente documento tienen una estructura de fórmula 1 o un derivado de la misma.



Fórmula 1

En la estructura ilustrada de fórmula 1, las líneas onduladas en las cadenas laterales de aminoácidos indican la existencia de un estereocentro indefinido. Cada uno de estos estereocentros se puede definir como "D" o "L" de

acuerdo con la convención estándar de aminoácidos. Por consiguiente, el tetrapéptido cíclico de fórmula 1 puede tener una configuración de aminoácidos de una de LDDL, DDLL, DDDL, DDL, LDDD, LLLL, DDDD, LLDL, DLLL, DLDL, LLLD, LLDD, DLDD o DLLD. Las discusiones de análogos o derivados en el presente documento excluyen expresamente el CJ-15,208, que tiene una configuración de aminoácidos de LDLL.

Tal como se utiliza en el presente documento, se considera que los “derivados” incluyen cambios de R con respecto a las cadenas laterales de aminoácidos de aminoácidos del tetrapéptido cíclico de fórmula 1. Se considera que los derivados incluyen intercambios de átomos o sustituyentes, tales como uno o más átomos de hidrógeno que se sustituyen por un alquilo, halógeno, hidroxilo, amina o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en la técnica se conocen varios derivados de fenilalanina (Phe) y triptófano (Trp). Por consiguiente, los derivados de Phe y Trp pueden incluir cambios donde uno o más átomos de hidrógeno, carbono o heteroátomos de la cadena lateral se sustituyen por uno o más de halo, amino, alquilo de cadena recta, alquilo ramificado, alquiloxi, nitro, haloalquilo, ciano o hidroxilo.

Los tetrapéptidos cíclicos dados a conocer y reivindicados en el presente documento son completamente diferentes en estructura de los ligandos opioides conocidos, que suelen ser o bien péptidos o bien no péptidos. Por ejemplo, los tetrapéptidos cíclicos carecen de una amina básica de extremo N-terminal libre que se encuentra en ligandos de péptidos opioides endógenos y otros péptidos con alta afinidad para receptores opioides. Curiosamente, cambiar la estereoquímica del resto de Trp, que se cree que es importante para la unión de KOR, resulta en un nuevo análogo que conserva la afinidad de KOR comparable a la CJ-15,208 primario, lo cual es sorprendente e inesperado. Tanto en CJ-15,208 como en el análogo D-Trp de CJ-15,208 (ciclo [Phe-D-Pro-Phe-D-Trp] (fórmula 2802). En la patente estadounidense n.º 8.809.278 se mostró que la sustitución de Phe por Ala potencia la afinidad del tetrapéptido cíclico para KOR aproximadamente de 4 a 10 veces. A diferencia de los péptidos lineales, los tetrapéptidos cíclicos son metabólicamente estables a las proteasas y presentan una penetración de membrana potenciada (por ejemplo, a través de la barrera hematoencefálica).

Los tetrapéptidos cíclicos mostrados a continuación en las tablas 1 y 2 pueden utilizarse como analgésicos para el tratamiento del dolor. Además, estos tetrapéptidos cíclicos, que son ligandos receptores opioide, pueden utilizarse en la prevención, inhibición y/o tratamiento del abuso de drogas, específicamente para tratar, inhibir y/o prevenir el comportamiento de búsqueda de droga inducido por estrés. Los tetrapéptidos cíclicos pueden ser metabólicamente estables y pueden estar activos tras la administración sistémica (por ejemplo, oral (por vía oral), subcutánea, s.c., o intravenosa, i.v.). Los antagonistas de tetrapéptido cíclico pueden bloquear la reincorporación inducida por estrés del comportamiento de búsqueda de droga después de la administración sistémica.

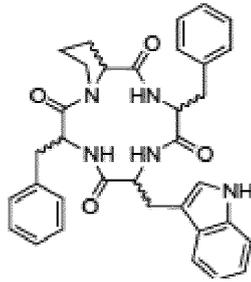
En una realización, los tetrapéptidos cíclicos dados a conocer y reivindicados en el presente documento pueden utilizarse como analgésicos. Los agonistas de receptores opioides son compuestos farmacológicos que activan los receptores opioides. Los opioides agonistas completos activan los receptores opioides completamente resultando en el efecto opioide completo. Ejemplos de agonistas completos son la heroína, la oxycodona, la metadona, la hidrocodona, la morfina, el opio y otros. Los tetrapéptidos dados a conocer y reivindicados se demuestran en el presente documento que tienen propiedades analgésicas similares a los opioides tradicionales. Como tal, los tetrapéptidos cíclicos dados a conocer y reivindicados en el presente documento pueden utilizarse para tratar y/o inhibir el dolor tratable por un analgésico.

Se estudió la funcionalidad de los tetrapéptidos cíclicos mediante la preparación de isómeros estereoquímicos de CJ-15,208, y el ensayo de las interacciones con los receptores opioides *in vitro* y en diversos modelos de dolor *in vivo*. Actualmente se ha encontrado que los cambios estereoquímicos en los aminoácidos en el tetrapéptido cíclico en realidad aumentaron los efectos analgésicos en ensayos de dolor relevantes de una manera sorprendente e inesperada.

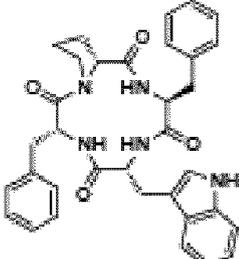
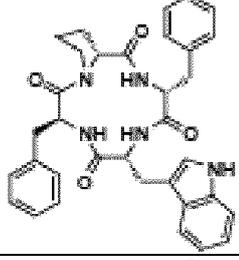
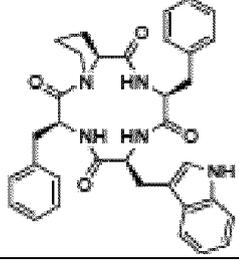
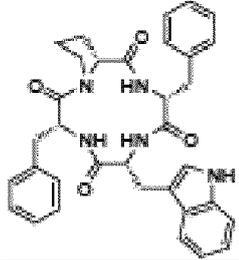
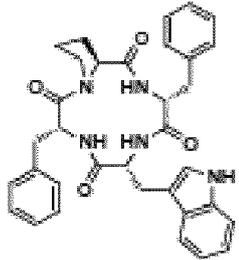
Debido a que se conoce que los ligandos de receptores opioides tienen efectos en el sistema nervioso central, los tetrapéptidos cíclicos dados a conocer y reivindicados en el presente documento también pueden utilizarse para el tratamiento del abuso de drogas mediante el bloqueo de la reincorporación inducida por estrés del comportamiento de búsqueda de droga después de la administración sistémica (véase, por ejemplo, la figura 5). Las drogas incluidos en esto son al menos cocaína, alcohol, metanfetaminas, anfetaminas, opioides (por ejemplo, alcaloides opioides narcóticos, morfina, codeína, heroína, oxycodona, hidrocodona y cualquier alcaloide de bencilisoquinolina; opiáceos sintéticos, fentanilo, meperidina y metadona). En consecuencia, los tetrapéptidos cíclicos podrían utilizarse como profiláctico para prevenir la recaída a la adicción a las drogas. Se espera que los tetrapéptidos cíclicos también puedan ser activos en modelos para el tratamiento de drogas de uso indebido distintos de la cocaína, específicamente opiáceos y anfetamina, y posiblemente otros (por ejemplo, el alcohol y la nicotina).

Asimismo, en una realización, los tetrapéptidos cíclicos dados a conocer en el presente documento pueden utilizarse para tratar, inhibir y/o prevenir la depresión. Basándose en la actividad de los ligandos de receptores opioides de moléculas pequeñas, se espera que los tetrapéptidos cíclicos presenten actividad antidepressiva. Del mismo modo, los tetrapéptidos cíclicos se pueden utilizar para tratar, inhibir y/o prevenir la ansiedad.

Estructuras de isómeros estereoquímicos de CJ-15,208

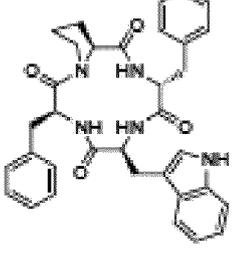


Número JVA	Compuesto	Estructura
2801 (LDLL) *	ciclo [Phe-D-Pro-Phe-Trp]	
2802 (LDLD)	ciclo [Phe-D-Pro-Phe-D-Trp]	
3606 (LDDL)	ciclo [Phe-D-Pro-D-Phe-Trp]	
3605 (DDLL)	ciclo [D-Phe-D-Pro-Phe-Trp]	
3607 (DDDL)	ciclo [D-Phe-D-Pro-D-Phe-Trp]	

3609 (DDLD)	ciclo [D-Phe-D-Pro-Phe-D-Trp]	
3608 (LDDD)	ciclo [Phe-D-Pro-Phe-D-Trp]	
3612 (LLLL, todo L)	ciclo [Phe-Pro-Phe-Trp]	
3613 (DDDD, todo D)	ciclo [D-Phe-D-Pro-Phe-D-Trp]	
3023 (DDTS)	ciclo [D-Phe-Pro-D-Phe-D-Trp]	

\*La notación abreviada entre paréntesis indica las configuraciones de aminoácidos dentro del péptido.

Tabla 1

Número JVA	Compuesto	Estructura
3636 (LLDL)	ciclo [Phe-Pro-D-Phe-Trp]	

3637 (LLLL)	ciclo [D-Phe-Pro-Phe-Trp]	
3638 (DDL)	ciclo [D-Phe-Pro-D-Phe-Trp]	
3639 (LLLD)	ciclo [Phe-Pro-Phe-D-Trp]	
3640 (LLDD)	ciclo [Phe-Pro-D-Phe-Trp]	
3641 (DLLD)	ciclo [D-Phe-Pro-Phe-D-Trp]	

Tabla 2

5 Los isómeros estereoquímicos de péptido cíclico de CJ-15,208 dados a conocer en el presente documento y mostrados en la tabla 1 se sintetizaron por una combinación de síntesis de fase sólida con ciclación en disolución.

10 Los péptidos de la tabla 1 mostrados a continuación en las tablas 3 y 4 se evaluaron en ensayos de unión de radioligando para afinidades de los receptores opioides mu, kappa y delta *in vitro*, y en el ensayo de extracción de cola de agua caliente a 55 °C *in vivo* en el ratón para actividad antagonista opioide y antinocicepción. Adicionalmente, los péptidos 3605, 3607 y 3608 mostraron propiedades analgésicas significativas cuando se evaluaron en otros modelos de dolor (figuras 1-3B), y los péptidos 3605 y 3607 no mostraron evidencia de inducir el comportamiento de búsqueda de droga cuando se evaluaron en un ensayo de respuesta en lugar condicionado (figura 4).

Afinidades de unión de receptor *in vitro*<sup>a</sup>

15

Número JVA	K <sub>i</sub> (nM ± SEM) <sup>b</sup>			Selectividad KOR/MOR/DOR
	KOR	MOR	DOR <sup>c</sup>	
2801 (CJ-15,208)	35,4 ± 3,6 (4)	619 ± 87 (3)	1720 ± 350 (5)	1/18/49

	16,9 ± 5,2 (3)	200 ± 54 (2)		1/12/102
3605	5120 ± 690	>10.000 (4)	>10.000	
3606	362 ± 51	3920 ± 200 (3)	>10.000	1/11/>27
3607	2560 ± 480	7780 ± 410	>10.000	1/3/>3,8
2802 ([D-Trp]CJ-15,208)	30,6 6 3,4 (5)	259 ± 29	4190 ± 860 (6)	1/8,5/137
	7,0 6 4,8 (3)			1/37/599
3609	>10.000	>10.000	>10.000	-
3608	353 ± 19	5800 ± 1450	>10.000	1/16/>28
3613	2010 ± 270	>10.000	>10.000	1/>4,9/4,9

<sup>a</sup> Ninguno de estos compuestos presenta actividad agonista en KOR o MOR en el ensayo GTP $\gamma$ S a 10  $\mu$ M.

Table 3

- 5 Los estereoisómeros de tetrapéptidos cíclicos de CJ-15,208 tienen una afinidad relativamente baja para KOR, MOR y DOR. Sólo dos estereoisómeros, 3606 y 3608, presentan  $K_i < 1 \mu$ M y estos estereoisómeros muestran una afinidad muy baja para MOR ( $K_i > 1 \mu$ M) y una afinidad insignificante para DOR. Ninguno de estos estereoisómeros presenta evidencia de actividad agonista en el ensayo funcional *in vitro*.
- 10 Sin embargo, los análogos presentaron generalmente potente antinocicepción *in vivo* comparable a la de CJ-15,208 tras la administración tanto intracerebroventricular (i.c.v.) como oral (por vía oral), a pesar de las reducciones en afinidades de receptores opioides *in vitro* (tabla 4).

Actividad antinociceptiva y antagonista opioide:

Número JVA	ED <sub>50</sub> (95% CI)		Receptores implicados	Antagonismo (dosis, nmol)
	i.c.v. (nmol)	p.o. (mg/kg)		
2801 (CJ-15,208)	1,74 (0,62-4,82)	3,49 (1,98-5,73)	KOR, MOR	KOR
3605	0,75 (0,36-1,44)	7,62 (5,12-12,2)	KOR, MOR, DOR	KOR (30), DOR (100)
3606	Agonista parcial (~60% máx)	>30 (~45% de respuesta @ 30 mg/kg)	KOR, MOR	Ninguno (100)
3607	1,00 (0,64-1,60)	4,12 (3,30-5,31)	KOR, DOR (MOR no)	Ninguno (30)
2802 ([D-Trp] CJ-15,208)	~40% @ 30 nmol	~25% @ 60 mg/kg	KOR	KOR
3609	2,39 (1,40-4,56)	≥ 10 mg/kg (~60% a 30 mg/kg)	DOR, KOR (MOR no)	Ninguno (30)
3608	0,56 (0,38-0,91)	4,72 (3,70-6,39)	KOR, MOR, DOR	DOR(100)
3613	0,51 (0,39-0,67)	2,47 (0,97 - 4,71),	DOR MOR (KOR no)	DOR (30)

Tabla 4

- 20 Todos de estos estereoisómeros de 2801 y 2802 excepto 3606 son potentes agonistas completos en el ensayo de antinocicepción después de la administración central. Todos de estos estereoisómeros excepto 3606 y 3609 son potentes agonistas completos después de la administración oral. Curiosamente, estos resultados *in vivo* no se correlacionan con los resultados *in vitro*. Esto indica que el(los) mecanismo(s) de agonismo *in vivo* de receptores opioides puede(n) ser complejo(s).
- 25 La evidencia mostró que múltiples receptores opioides contribuyeron a la antinocicepción de cada análogo. Estos incluyen compuestos donde los receptores opioides mu (MOR) no están implicados (3607 y 3609), y los compuestos en los que receptores opioides kappa (KOR) no están implicados (3613). A diferencia de los péptidos primarios (es decir, 2801 y 2802), solo uno de los análogos presentó antagonismo de KOR *in vivo*. Sólo un estereoisómero, 3605, presenta actividad antagonista de KOR, pero la respuesta a la dosis del antagonismo de este compuesto es inusual.
- 30 Tres de los estereoisómeros, 3605, 3608 y 3613, presentan actividad antagonista de DOR. En una comparación interesante con los otros tetrapéptidos cíclicos, el compuesto 3613 (DDDD) es un agonista del receptor opioide mu (MOR) y antagonista del receptor opioide delta (DOR). Los agonistas de MOR/antagonistas de DOR son de gran interés debido a su perfil de sensibilidad reducida (disminución de potencial de adicción y el perfil de sensibilidad, tal como la tolerancia) en comparación con los agonistas de MOR como morfina. Además, el compuesto 3613 es eficaz para prevenir la reincorporación inducida por estrés del comportamiento de búsqueda de cocaína en el ensayo de preferencia de lugar condicionado (figura 5). Este es un resultado sorprendente dado que el compuesto 3613 no parece tener actividad antagonista de KOR.
- 35

Haciendo referencia ahora a las figuras 1-3B, datos de diversos ensayos muestran que los compuestos 3605, 3607 y 3708 muestran actividad contra el dolor en varios modelos. Estos modelos se basan en el ensayo de formol, el ensayo de estiramiento de ácido acético y el ensayo de constricción nerviosa. Los ensayos de estiramiento de ácido acético y formol son indicativos de actividad contra el dolor inflamatorio (es decir, dolor nociceptivo) y el ensayo de constricción nerviosa es indicativo de actividad contra el dolor neuropático.

El dolor inflamatorio (es decir, dolor nociceptivo) está causado por la estimulación de las fibras nerviosas periféricas que responden solo a estímulos que se acercan a o exceden la intensidad de daño (nociceptores), y pueden clasificarse según el modo de estimulación nociva. Las categorías más comunes son "térmica" (por ejemplo, calor o frío), "mecánica" (por ejemplo, aplastamiento, desgarrar, corte, etc.) y "química" (por ejemplo, sal o yodo en un corte).

El dolor neuropático está causado por daño o enfermedad que afectan a cualquier parte del sistema nervioso implicado en los sentimientos corporales (el sistema somatosensorial). El dolor neuropático periférico a menudo se describe como "ardor", "hormigueo", "corriente eléctrica", "punzada" o "alfileres y agujas".

La figura 1 demuestra que una administración oral de 3607 de 10 mg/kg es eficaz para aliviar el dolor en el ensayo de formol en comparación con la administración intraperitoneal de solución salina. El mismo consiste en la inyección de una disolución diluida de formol en la superficie de la pata trasera del roedor, seguida de la calificación de comportamientos estereotipados tales como estremecimiento, lamiendo y mordiendo la pata trasera afectada. Los comportamientos duran aproximadamente 1 hora, con la fase temprana o aguda (directamente después de la inyección) reflejando la activación directa de nociceptores y la fase tardía o tónica (15 a 20 minutos después de la inyección) reflejando la inflamación. La administración de 3607 produjo una reducción significativa en el tiempo empleado en lamer después de la administración de formol.

La figura 2 demuestra que la administración de 3607 fue efectiva para la reducción del dolor en el ensayo de estiramiento con ácido acético. El ensayo de estiramiento con ácido acético es un modelo para el dolor visceral y es el ensayo químico más popular de nocicepción. En el ensayo, se da a los sujetos una inyección subcutánea (s.c.) de droga o excipiente líquido 60 min antes de una inyección intraperitoneal (i.p.) de ácido acético al 0,6%. Después de la administración del ácido acético, los sujetos se colocan en jaulas transparentes (11 x 7 x 5 pulgadas) y se califican para estiramientos abdominales durante un período de observación de 20 min. El estiramiento se definió como contorsiones corporales, presión abdominal y extensión de las extremidades posteriores de las cuales se infirió nocicepción visceral. La administración de 10 mg/kg y 30 mg/kg de 3607 produjo una antinocicepción significativa en comparación con la administración de morfina. Y aunque el efecto de 3607 no fue tan pronunciado como con la morfina, las reducciones observadas en el estiramiento fueron significativas, indicación de que 3607 tiene un efecto significativo de reducción del dolor.

Haciendo referencia ahora a las figuras 3A-3B, las figuras 3A-3B demuestran que 3607 (figura 3A) y 3605 y 3608 (figura 3B) son adicionalmente activos en el ensayo de constricción nerviosa para dolor neuropático. En el ensayo de constricción nerviosa, un nervio de un roedor sujeto se ata o constriñe de manera crónica y luego se evalúa el animal con respecto a respuesta a estímulos de dolor tales como una retirada de pata. La figura 3A demuestra que 3607 a 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg produce un alivio significativo del dolor neuropático, en comparación con 50 mg/kg de gabapentina. La gabapentina es un tratamiento aceptado para el dolor neuropático. La figura 3B demuestra que 3605 y 3608 a 10 mg/kg p.o. producen un alivio significativo del dolor neuropático, en comparación con 50 mg/kg i.p. de gabapentina y el compuesto 2801.

De manera interesante, cuando se examina en un modelo de tolerancia aguda, la tolerancia antinociceptiva observada varió notablemente entre los péptidos, desde no mostrar importancia de tolerancia hasta un desplazamiento hacia la derecha en la curva dosis-respuesta igual o mayor que la presentada por la morfina.

Los cambios en la estructura del tetrapéptido macrocíclico se toleraron bien con retención de actividad antinociceptiva, mientras que el antagonismo de KOR fue muy sensible a cambios en los restos aromáticos. La identificación de compuestos con antinocicepción potente que presentan tolerancia disminuida en el examen inicial es un avance prometedor en la búsqueda de analgésicos potenciales con perfiles de sensibilidad mejorados.

Pruebas de sensibilidad:

Número JVA	Tolerancia aguda desplazamiento de ED <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Rotorod (10 mg/kg, p.o.)	Locomoción (CLAMS, 10 mg/kg, p.o.)	Depresión respiratoria 10 mg/kg p.o.)
2801 (CJ-15,208)	1,73	√ (10 y 60 mg/kg)		
3605	19,5-21,5	√ (sedación significativa @ 10 mg/kg, pero no 30 mg/kg)	√	Depresión respiratoria significativa
3606	Desplazamiento	√	Hipolocomoción	√

	sustancial <sup>c</sup>		significativa	
3607	5,19	√	√	√
2802 ([D-Trp] CJ-15,208)			√ (60 mg/kg)	
3609	1,87	√ (sedación significativa a 40-60 min solamente)	Hipolocomotion significativa	Depresión respiratoria
3608	9,87	√	Hipolocomotion significativa	Depresión respiratoria
3613	2,55	√	√	√

<sup>a</sup> El sulfato de morfina causa un desplazamiento de 9,2 veces en el ED<sub>50</sub> en estas condiciones; <sup>b</sup> √ indica que se ha sometido a prueba (si no hay otro comentario, entonces no hay efecto significativo); <sup>c</sup> No se puede calcular de forma fiable los valores de ED<sub>50</sub> porque el compuesto es un agonista parcial.

## 5 Tabla 5

Tal como se muestra en la tabla 5, los compuestos sometidos a prueba se comportaron generalmente bien en ensayos de someter a prueba la sensibilidad. En ensayos de tolerancia aguda, el desplazamiento en los valores de ED<sub>50</sub> varió notablemente desde mínimos (3609 y 3613) a más que la morfina (3605). Esto fue sorprendente. En una prueba de rotorod para sedación y coordinación motora, solo en el caso de 3605 hubo efectos similares al agonista selectivo de KOR U50,488, sugiriendo sedación.

Ninguno de los compuestos mostró hiperlocomoción similar a morfina y otros agonistas de MOR. Dado que la mayoría de los análogos no mostraron evidencia de sedación en el ensayo de rotorod, las disminuciones en la locomoción observadas probablemente no se deben a la sedación. Algunos análogos, concretamente, 3605, 3608 y 3609, mostraron evidencia de depresión respiratoria a 10 mg/kg, p.o.

Basándose en los perfiles de sensibilidad, los estereoisómeros más prometedores parecen ser 3607 y 3613.

Haciendo referencia ahora a la figura 4, se observó que los compuestos 3605 y 3607 no muestran evidencia de preferencia de lugar condicionado (comportamiento de búsqueda de droga) o aversión al lugar condicionado a continuación de la administración oral. Los compuestos 3605 y 3607 se compraron con morfina y U50,488, los cuales muestran preferencia de lugar condicionado significativa (comportamiento de búsqueda de droga) y aversión al lugar condicionado, respectivamente.

Péptidos que contienen L-prolina:

Resultados *in vitro*: Estos estereoisómeros muestran baja afinidad para KOR ( $K_i > 1\% \mu\text{M}$ ). También muestran generalmente baja afinidad para MOR, con solo dos estereoisómeros que presentan una  $K_i < 1 \mu\text{M}$ . Estos compuestos presentan una afinidad insignificante para DOR

Resultados *in vivo*:

Hasta la fecha, la mayoría de estos estereoisómeros sólo se han evaluado a continuación de la administración i.c.v. Solo se han evaluado análogos seleccionados en dosis  $> 10 \text{ nmol}$ .

Estereoisómeros con actividad antinociceptiva demostrada:

3612: ED<sub>50</sub> = 3,52 (2,01-6,42) nmol i.c.v., 4,28 (3,56-5,27) mg/kg p.o. (KOR, MOR y DOR implicados)

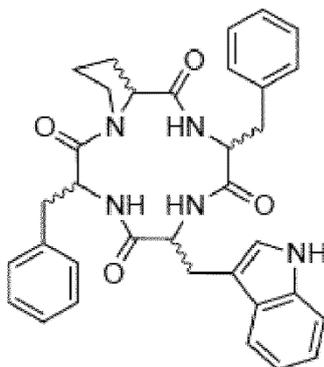
3638: ED<sub>50</sub> = 8,93 (1,96-19,5) nmol i.c.v.

3639: ED<sub>50</sub> = 49,7 (34,8-69,8) nmol i.c.v.

Hasta la fecha, no se ha detectado actividad antagonista o solo se ha detectado una actividad débil para estos estereoisómeros, pero algunos análogos sólo se han sometido a prueba a una dosis más baja (10 nmol i.c.v.)

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Tetrapéptido cíclico que tiene una secuencia de ciclo[Phe-Pro-Phe-Trp] y que tiene una estructura de fórmula 1, en el que el tetrapéptido cíclico tiene una configuración de aminoácidos de una de LDDL, DDLL, DDDL, DDLD, LDDD, LLLL, DDDD, LLDL, DLLL, DLDL, LLLD, LLDD, DLDD o DLLD, y en el que el tetrapéptido cíclico no tiene una configuración de aminoácidos de LDLL.



Fórmula 1

- 10 2. Tetrapéptido cíclico según la reivindicación 1, en el que el tetrapéptido cíclico tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD, DDLD o DDDD.
3. Tetrapéptido cíclico según la reivindicación 1, en el que el tetrapéptido cíclico tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD o DDDD.
- 15 4. Composición farmacéutica, que comprende:  
un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, y  
una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un tetrapéptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 20 5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el tetrapéptido cíclico tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD, DDLD o DDDD.
- 25 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el tetrapéptido cíclico tiene una configuración de aminoácidos de una de DDLL, DDDL, LDDD o DDDD.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el tetrapéptido cíclico tiene una configuración de aminoácidos de DDDL
- 30 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que el tetrapéptido cíclico tiene una configuración de aminoácidos de DDDD.
9. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz del tetrapéptido cíclico es eficaz para la analgesia.
- 35 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 4-8, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz del tetrapéptido cíclico es eficaz para tratar dolor inflamatorio.
- 40 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 4-8, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz del tetrapéptido cíclico es eficaz para tratar dolor inflamatorio y dolor neuropático.
12. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4-11 para su uso en el tratamiento y/o prevención del dolor.

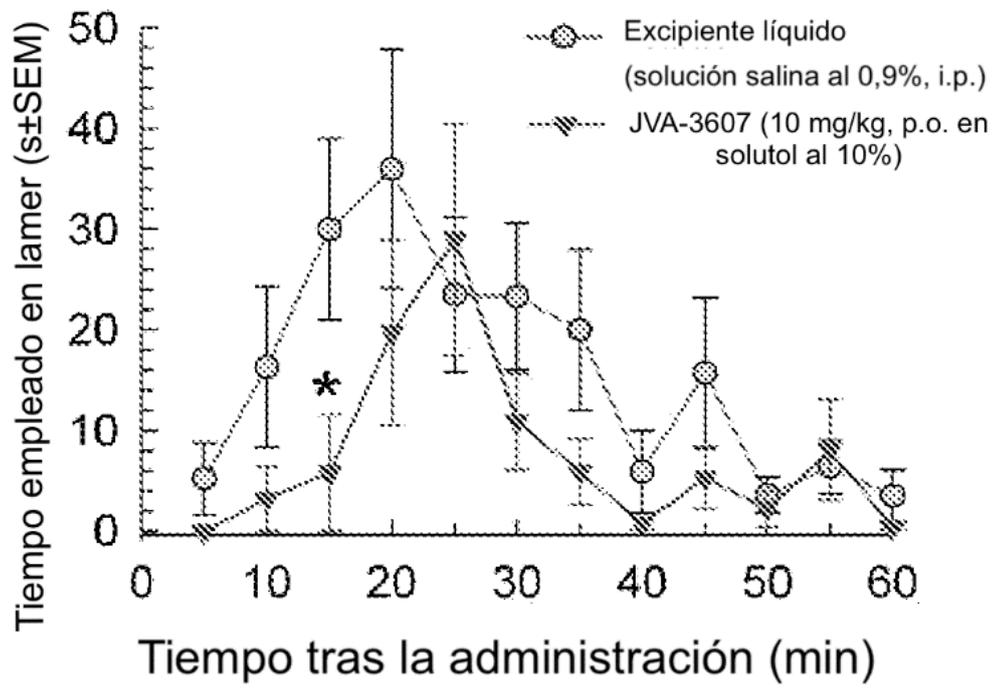


Figura 1

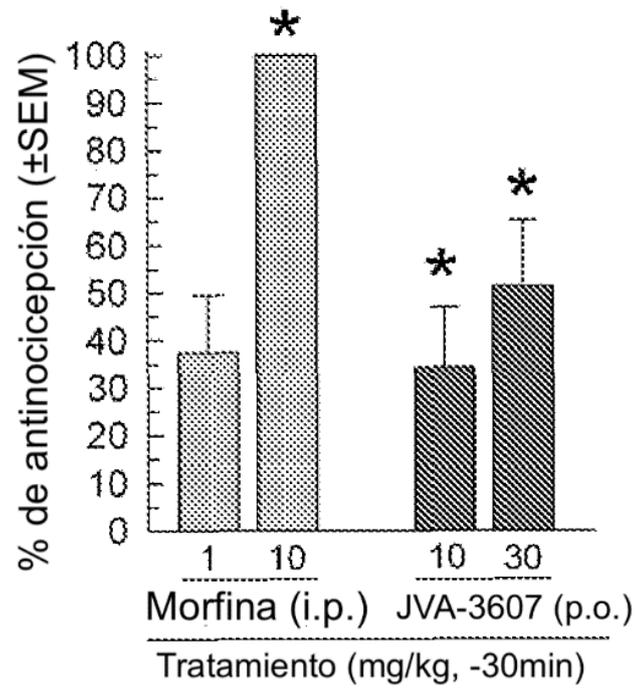


Figura 2

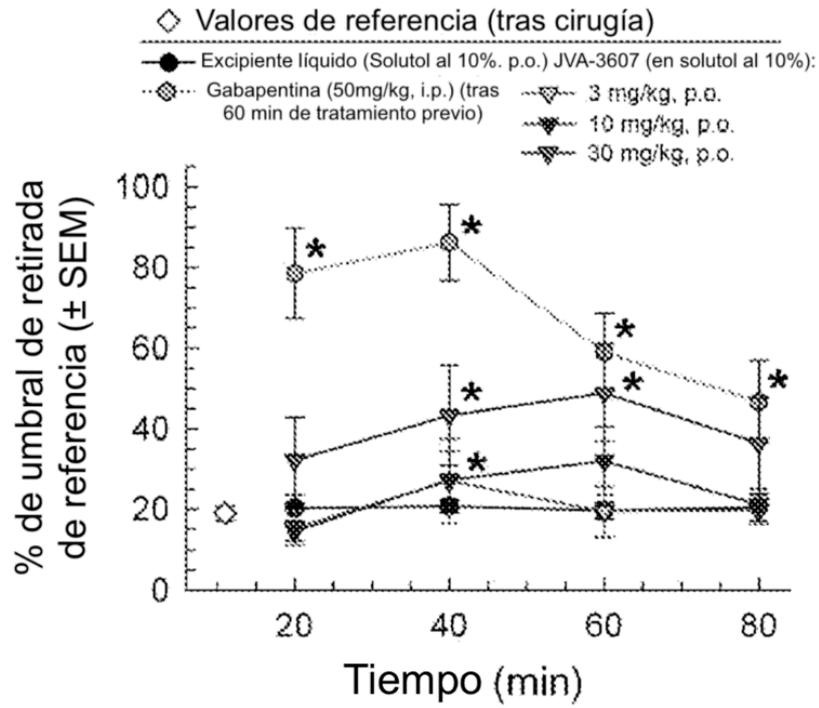


Figura 3A

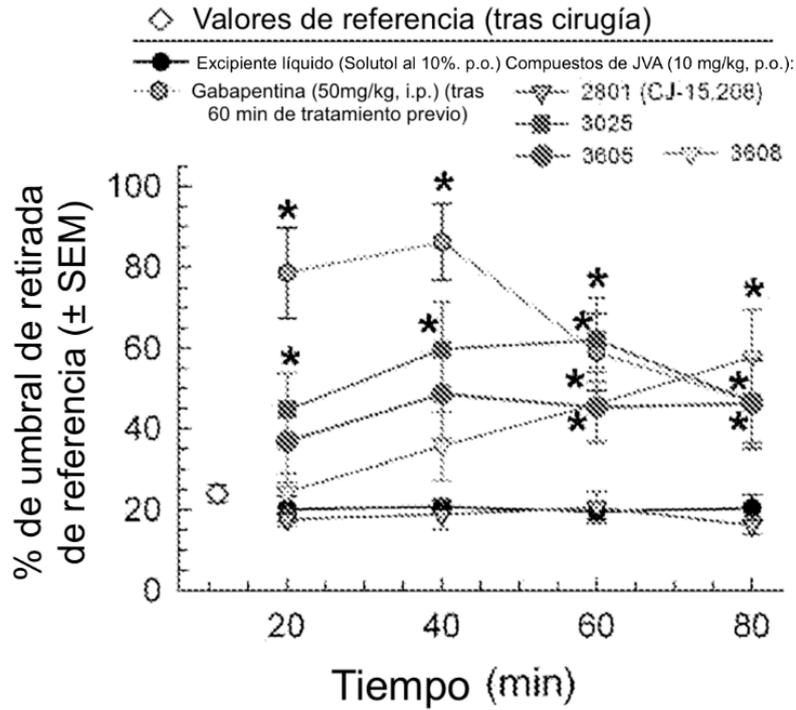


Figura 3B

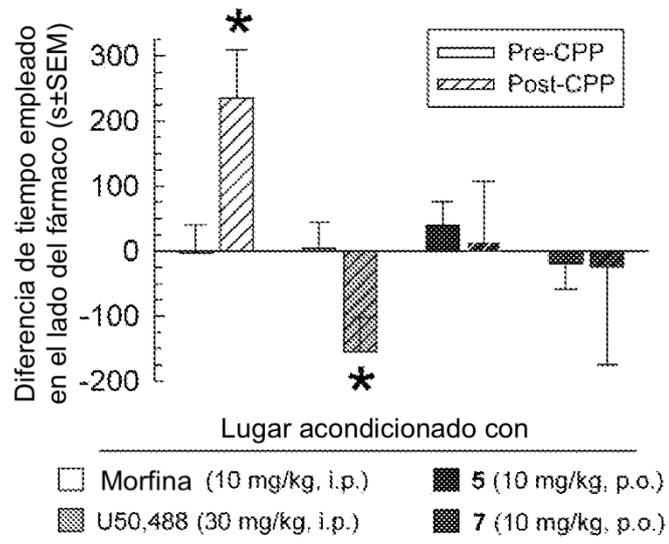


Figura 4

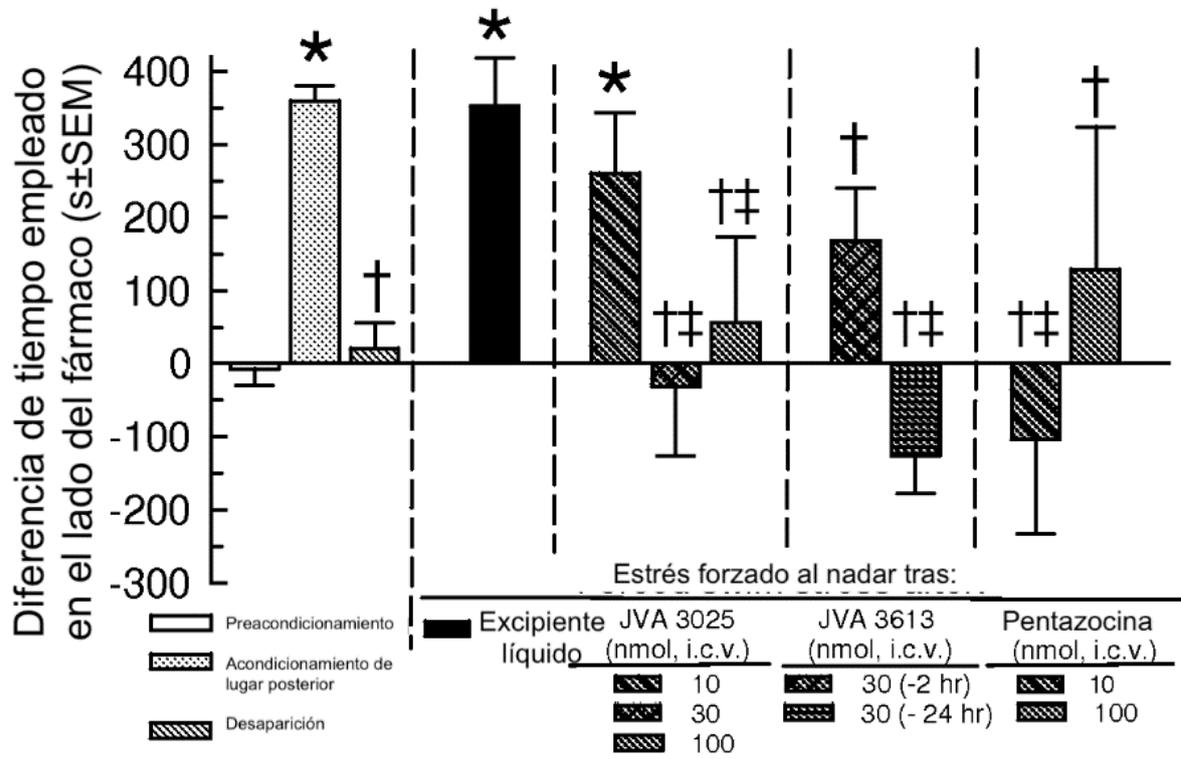


Figura 5