

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 210**

21 Número de solicitud: 201731170

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 25/32 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

02.10.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.04.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

02.07.2020

Fecha de concesión:

23.09.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

30.09.2020

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (100.0%)

Avenida Cervantes Nº2

29071 Málaga (Málaga) ES

72 Inventor/es:

MILLÓN PEÑUELA, Carmelo;

FLORES BURGESS, Antonio;

GAGO CALDERÓN, Belén;

GARCÍA FERNANDEZ, María Inmaculada;

NARVÁEZ BUENO, José Angel;

SANTÍN NÚÑEZ, Luis Javier y

DÍAZ CABIALE, Mª Zaida

74 Agente/Representante:

SAN MARTÍN ALARCIA, Esther

54 Título: **GAL(1-15) y análogos de la misma para uso en la reducción y consumo de alcohol**

57 Resumen:

GAL(1-15) y los análogos de la misma para su uso en la reducción del consumo de alcohol. La presente invención se refiere al uso de galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, o bien una composición farmacéutica o kit que comprende cualquiera de ellos, para su uso en la prevención y/o tratamiento de trastornos y efectos relacionados con el alcohol, en particular para su uso en la reducción del consumo de alcohol.

ES 2 707 210 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

GAL(1-15) y análogos de la misma para uso en la reducción y consumo de alcohol

Campo de la invención

5

La presente invención se refiere al campo médico, en particular a GAL(1-15) o a los análogos de la misma, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de los trastornos y efectos relacionados con el alcohol, especialmente en la disminución del consumo de alcohol.

10

Antecedentes de la invención

Según la Organización Mundial de la Salud (2014) el consumo de alcohol se considera un factor de riesgo importante y causante de enfermedades y mortalidad en todo el mundo. Los tratamientos actuales para los trastornos por consumo de alcohol (TCA) poseen una limitada eficacia, producen efectos adversos graves y presentan altas tasas de recaída. Debido a la ausencia de tratamientos efectivos, se hace importante hallar nuevas dianas biológicas que puedan modular el consumo de alcohol. Existen numerosos neurotransmisores implicados en los TCA, como por ejemplo, GABA, glutamato, dopamina, noradrenalina, serotonina y varios neuropéptidos endógenos (Schneider *et al.*, 2007; Marcinkiewicz *et al.*, 2016).

Galanina (GAL) es un neuropéptido (Tatemoto *et al.*, 1983) ampliamente distribuido en las neuronas del sistema nervioso central (SNC) (Jacobowitz *et al.*, 2004). Se han clonado tres subtipos de receptores de GAL (GALR1-3) que cuentan con una alta afinidad por GAL (Branchek *et al.*, 2000; Mitsukawa *et al.*, 2008). GALR1 y GALR3 activan principalmente las proteínas-G inhibitoras Gi/Go, mientras que GALR2 se acopla principalmente a Gq/G11 para mediar en una señalización excitatoria (Branchek *et al.*, 2000).

GAL participa en una serie de funciones centrales que modulan los niveles neuroendocrinos, el control del dolor y las funciones cardiovasculares, además de la ingesta de alimento y los trastornos del estado de ánimo (Mitsukawa *et al.*, 2008; Diaz-Cabiale *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2015). GAL y sus receptores están implicados en las adicciones y toxicomanías (Picciotto, 2008), que incluyen la ingesta de alcohol y el alcoholismo (Lewis *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2005). La microinyección de GAL en el tercer ventrículo aumentaba el consumo de etanol en ratas Sprague-Dawley dentro de la prueba de elección entre dos frascos con una

disolución de etanol al 7% en agua; este aumento se revertía por completo con el antagonista M40 del receptor de GAL (Lewis *et al.*, 2004). Estos efectos de GAL sobre el consumo de etanol también se encontraron con inyecciones de GAL directamente en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo (Rada *et al.*, 2004). Además, los ratones que sobreexpresan GAL muestran un aumento en su preferencia e ingesta de etanol en comparación con sus iguales de tipo salvaje (Karatayev *et al.*, 2009), mientras que los ratones que no expresan GAL beben menos etanol y su preferencia por él disminuye (Karatayev *et al.*, 2010). No solo el NPV, sino también el circuito de recompensa parece estar implicado en los efectos de GAL que fomentan la toma de alcohol. GAL puede incrementar la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (NAC) (Rada *et al.*, 1998), siendo este efecto consistente con la capacidad de GAL para aumentar los efectos de recompensa del alcohol (Picciotto *et al.*, 2010).

Junto a GAL, también son activos en el SNC los fragmentos N-terminales conocidos como GAL(1-15) (Hedlund *et al.*, 1996; Diaz-Cabiale *et al.*, 2005; Diaz-Cabiale *et al.*, 2010; Millon *et al.*, 2015; Millon *et al.*, 2016; Flores-Burgess *et al.*, 2017; Millon *et al.*, 2017). Tanto las moléculas de GAL como de GAL(1-15) poseen funciones específicas en la regulación cardiovascular e interaccionan de forma diferente con otros neuropéptidos (Diaz-Cabiale *et al.*, 2005). Recientemente hemos descrito que GAL(1-15) induce en ratas fuertes efectos de tipo ansiógeno y relacionados con la depresión, y que estos efectos resultan significativamente más fuertes que los inducidos por GAL. Los complejos de heterorreceptores GALR1/GALR2 en el hipocampo dorsal y especialmente en el rafe dorsal, zonas ricas en puntos de unión con GAL(1-15) (Hedlund *et al.*, 1992), estaban implicados en estos efectos (Millon *et al.*, 2015). La presencia de puntos de unión específicos para GAL(1-15) en el hipocampo dorsal, la neocorteza y el cuerpo estriado (Hedlund *et al.*, 1992), que son parte del sistema mesolímbico de la dopamina (Koob, 1992), sugieren una función de GAL(1-15) dentro de los circuitos relacionados con los efectos motivacionales y de recompensa en las toxicomanías.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que GAL(1-15) con la fórmula general:
Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o

GWTLNSAGYLLGPHA,

o los análogos de la misma, o sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos

farmacéuticamente aceptables, pueden usarse para prevenir y/o tratar trastornos y efectos relacionados con el alcohol, en especial en la reducción de su consumo se refiere.

Breve descripción de la invención

5

El consumo de alcohol se considera un factor de riesgo importante causante de enfermedades y mortalidad en todo el mundo. Debido a la ausencia de tratamientos eficaces para los trastornos por consumo de alcohol (TCU), se hace importante hallar nuevas dianas biológicas que puedan modular el consumo de alcohol. Se ha comprobado la función de GAL(1-15) en el consumo voluntario de etanol en ratas mediante el paradigma de elección entre dos frascos, así mismo se han comparado los efectos de GAL(1-15) con la molécula completa de galanina (GAL). En la presente invención se describe la primera vez que GAL(1-15), a través de mecanismos centrales, induce una fuerte reducción en la preferencia y consumo de etanol en ratas. Estos efectos fueron significativamente diferentes que en GAL. El receptor 2 de galanina (GALR2) estaba implicado en dichos efectos, ya que el antagonista M871 específico de GALR2 bloqueaba las acciones mediadas por GAL(1-15) en la preferencia e ingesta de etanol. De forma importante, el mecanismo de esta acción implica cambios en la expresión de GALR y también en el gen temprano inmediato *C-Fos*, así como en el gen relacionado con la internalización de receptores *Rab5* en el cuerpo estriado. La relevancia del cuerpo estriado como una diana para GAL(1-15) fue respaldada por el efecto de GAL(1-15) sobre la actividad locomotora de las ratas después de la administración de etanol. Estos resultados fundamentan la base para el desarrollo de estrategias de terapias novedosas mediante el uso de análogos de GAL(1-15) para el tratamiento de los TCA en humanos.

25

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, la presente invención se refiere al uso, como se indicó, de GAL(1-15) o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, para la prevención y/o tratamiento de los trastornos relacionados con el alcohol como la intoxicación aguda, uso nocivo, síndrome de dependencia, estado de abstinencia y otros trastornos mentales, y de comportamiento inducidos por el alcohol debido al consumo del mismo. En particular, la presente invención se refiere al uso de GAL(1-15) o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, apropiado para reducir el consumo de alcohol.

35

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Diseño experimental de la ingesta voluntaria de etanol.

Fig. 2. Curva de dosis-respuesta de galanina (1-15) [GAL15] en el paradigma de elección entre dos frascos con una concentración de etanol al 10% (EtOH) en ratas. GAL15 (a 1 o 3 nmol/rata) se administró i.c.v. 2, 14 y 24 horas antes de las mediciones. Se utilizaron como grupo vehículo ratas inyectadas con líquido cefalorraquídeo. Las barras verticales representan la media $\pm$ EEM (n = 6-18 animales por grupo) de ingesta de EtOH (g/kg; a, b, c), ingesta de agua (g/kg; d, e, f), preferencia por EtOH (%; g, h, i) e ingesta de pienso (g; j, k, l) durante los diferentes periodos. (a) $^a p < 0,05$ frente al resto de grupos (gráficas restantes) $^* p < 0,05$ frente al grupo vehículo de acuerdo con el análisis ANOVA unidireccional seguido de la prueba LSD de Fisher.

Fig. 3. Efecto de la administración de galanina (GAL) y galanina (1-15) [GAL15] en el paradigma de elección entre dos frascos con una concentración de etanol (EtOH) al 10% en ratas. GAL (3 nmol/rata) y GAL15 (3 nmol/rata) se administraron i.c.v. 2, 14 y 24 horas antes de las mediciones. Se utilizaron como grupo vehículo ratas inyectadas con líquido cefalorraquídeo. Las barras verticales representan la media $\pm$ EEM (n = 7-15 animales por grupo) de ingesta de EtOH (g/kg; a, b, c), ingesta de agua (g/kg; d, e, f), preferencia por EtOH (%; g, h, i) e ingesta de pienso (g; j, k, l) durante los diferentes periodos. (a) $^* p < 0,05$ frente al vehículo $^{**} p < 0,01$ frente al grupo de 3 nmol de GAL 15 (resto de gráficas) $^* p < 0,05$ frente al resto de grupos de acuerdo con el análisis ANOVA unidireccional seguido de la prueba LSD de Fisher.

Fig. 4. Efectos de la coadministración del antagonista M871 del receptor GALR2 (3 nmol/rata) y galanina (1-15) [GAL15] en el paradigma de elección entre dos frascos con una concentración de etanol (EtOH) al 10% en ratas. Los tratamientos se inyectaron i.c.v. 2 horas antes de las mediciones. Se utilizaron como grupo vehículo ratas inyectadas con líquido cefalorraquídeo. Las barras verticales representan la media $\pm$ EEM (n = 7-21 animales por grupo) de (a) ingesta de EtOH (g/kg), (b) ingesta de agua (g/kg), (c) preferencia por EtOH (%) y (d) ingesta de pienso (g) durante los diferentes periodos. $^* p < 0,05$ frente al resto de grupos de acuerdo con el análisis ANOVA unidireccional seguido de la prueba LSD de Fisher.

Fig. 5. Efectos de galanina (1-15) [GAL15] en la expresión del ARNm en el cuerpo estriado

de *C-Fos* (a), *Rab5* (b), *GALR1* (c) y *GALR2* (d) en ratas expuestas al paradigma de elección entre dos frascos. GAL15 se inyectó i.c.v. 2 horas antes de las mediciones. Se utilizaron como grupo vehículo ratas inyectadas con líquido cefalorraquídeo. Las barras verticales representan la media $\pm$ EEM (n= 5-6 animales por grupo). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 frente al grupo vehículo/EtOH de acuerdo con la prueba de la *t* de Student.

Fig. 6. Efectos de galanina 1-15 [GAL15] en la modificación locomotora inducida por etanol en ratas. GAL 15 (3 nmol; i.c.v.) se inyectó 20 minutos antes de la prueba y la inyección aguda de etanol (1,75 g/kg; i.p.) se administró 5 minutos antes de la prueba. Los datos representan la media $\pm$ EEM (n=6-8 de animales por grupo) de la distancia total recorrida (a) y la velocidad media (b) en campo abierto durante un periodo de prueba de 5 minutos. ***p<0,001 según el análisis ANOVA bidireccional seguido de la prueba LSD de Fisher.

Descripción detallada de la invención

En la invención actual, la función de GAL(1-15) por vía intracerebroventricular (i.c.v.) dentro del consumo voluntario de etanol en ratas ha sido evaluada mediante el paradigma de elección entre dos frascos, y además se han comparado los efectos de GAL (1-15) con los de GAL. Adicionalmente, la implicación del GALR2 en los efectos mediados por GAL(1-15) en esta prueba se analizó con el antagonista selectivo M871 del receptor GALR2. Para investigar si el efecto de GAL(1-15) en el consumo voluntario de etanol estaba asociado con el circuito de recompensa, el efecto de GAL(1-15) en la expresión del gen temprano *C-Fos*, el gen relacionado con la internalización de receptores *Rab5* y *GALR1* y *GALR2*, éste se ha estudiado en el cuerpo estriado. Por consiguiente, también se han investigado los efectos del tratamiento con GAL(1-15) sobre la actividad locomotora inducida por el alcohol.

La inducción de una fuerte reducción en la preferencia y el consumo de etanol en ratas mediante GAL(1-15), a través de los mecanismos centrales, se ha descrito aquí por primera vez. Estos efectos fueron significativamente diferentes de los de GAL lo que muestra una función diferente de GAL en comparación con GAL(1-15) en cuanto al comportamiento relacionado con el consumo de alcohol. GALR2 estaba implicado en estos efectos, ya que el antagonista M871 específico de GALR2 bloqueaba las acciones mediadas por GAL(1-15) en la preferencia e ingesta de etanol. De forma importante, el mecanismo de esta acción implica cambios en la expresión de los receptores de GAL y también en el gen temprano inmediato *C-Fos* además de en el gen relacionado con la internalización de receptores *Rab5*

en el cuerpo estriado, zona rica en puntos de unión del fragmento GAL (Hedlund *et al.*, 1992) e importante en los efectos motivacionales y de recompensa de las toxicomanías (Koob, 1992). La importancia del cuerpo estriado como diana para GAL(1-15) fue también respaldada por el efecto de GAL(1-15) sobre la actividad locomotora de las ratas después de la administración de etanol.

GAL(1-15) a una dosis de 3 nmol indujo una reducción pronunciada de la preferencia y el consumo de etanol en la prueba de elección entre dos frascos a las 2 horas, efecto que se mantuvo a las 24 horas. Teniendo en cuenta que este paradigma de beber alcohol eligiendo entre dos frascos induce a una ingesta voluntaria de grandes cantidades de alcohol (Simms *et al.*, 2008), los datos actuales sugieren que GAL(1-15) puede usarse como fármaco para tratar los TCA en humanos.

Se ha mostrado anteriormente que GAL(1-15) aumenta los comportamientos de tipo depresivo y similares a la ansiedad en ratas (Millon *et al.*, 2015; Millon *et al.*, 2017). Aunque los estados emocionales como la ansiedad son variables relevantes para modular el comportamiento de toma de alcohol mediante el aumento del consumo y la preferencia de alcohol (Chappell *et al.*, 2013), los efectos mediados por GAL(1-15) parecen no implicar regulación emocional ya que se observó una reducción en la ingesta y la preferencia de alcohol.

Además, una posible explicación para la reducción de la ingesta de alcohol inducida por la administración central de GAL(1-15), es que GAL(1-15) en sí misma puede inducir aversión más que atenuar las propiedades de recompensa del alcohol. Sin embargo, las dosis seleccionadas de GAL(1-15) no tienen efecto sobre la ingesta de pienso y agua, lo que sugiere que la reducción en la ingesta de alcohol no está condicionada por una aversión al alcohol.

Puesto que GAL(1-15) no modificaba la ingesta de pienso en ratas que habían consumido etanol de forma crónica, puede también sugerirse que en nuestro modelo, las ratas no consumían etanol solo por sus calorías (Lewis *et al.*, 2004).

Además, los efectos de GAL(1-15) en la prueba de elección entre dos frascos fueron significativamente diferentes a los efectos correspondientes inducidos por GAL. En nuestro modelo, una dosis de GAL de 3 nmol no tenía efecto con respecto al grupo vehículo en

todos los parámetros analizados. En estudios previos, GAL microinyectada en el tercer ventrículo aumentaba la ingesta de etanol el 7% en la prueba de elección entre dos frascos (Lewis *et al.*, 2004), y este aumento fue mayor durante la fase ligera, donde los animales están inactivos y normalmente beben muy poco (Lewis *et al.*, 2004). Los diferentes resultados hallados en el presente trabajo podrían explicarse por las diferencias de porcentaje de etanol y el ciclo de luz/oscuridad usado, ya que se utilizó una elección entre etanol al 10% frente a agua, por lo que el porcentaje de disolución de etanol podría afectar al resultado de la prueba (Leeman *et al.*, 2010; Tarragon *et al.*, 2012). Además, las mediciones se realizaron en el periodo de oscuridad, cuando las ratas están más activas, mientras que la ingesta de etanol producida por GAL fue mayor en el periodo de luz (Lewis *et al.*, 2004).

Sin embargo, debido a que GAL(1-15) reduce la preferencia y el consumo de etanol, con GAL produciendo el efecto opuesto según otros autores, en la presente invención se validan y amplían las perspectivas sobre la función específica de GAL(1-15) en la ingesta de etanol.

Previamente se ha descrito una actuación diferente de GAL y GAL(1-15) respecto a las funciones del comportamiento (Millon *et al.*, 2017). GAL(1-15) induce en las ratas fuertes efectos de tipo ansiógeno y relacionados con la depresión y estos efectos eran significativamente más fuertes que los inducidos por GAL (Millon *et al.*, 2015). GAL(1-15) también es capaz de aumentar los efectos antidepresivos inducidos por el agonista 8-OH-DPAT del receptor 5HT1A durante la prueba de natación forzada, un efecto que resulta, una vez más, significativamente más fuerte que el inducido por GAL (Millon *et al.*, 2016). La acción diferente entre GAL y GAL(1-15) no solo se observó en las funciones del comportamiento, sino también en la regulación cardiovascular central (Diaz-Cabiale *et al.*, 2005; Diaz-Cabiale *et al.*, 2010). Nuestros resultados en relación a la ingesta de etanol confirman una acción única de GAL(1-15) dentro de la comunicación cerebral.

El mecanismo que explicaba las diferencias entre GAL y GAL(1-15) radica en que el sitio preferido de unión del fragmento de GAL N-terminal es el resultado de la formación de heterómeros GALR1/GALR2 altamente específicos para los fragmentos de GAL (Fuxe *et al.*, 2008; Fuxe *et al.*, 2012; Millon *et al.*, 2015). El hecho de que el antagonista M871 del receptor GALR2 bloqueara la reducción en la preferencia y la ingesta de etanol inducida por GAL(1-15), confirma que GAL(1-15) actúa a través del heterodímero GALR1/GLR2 para reducir la preferencia y el consumo de etanol.

Los receptores de GAL implicados en el alcoholismo no están bien definidos; sin embargo, varios estudios indican que GALR3 está implicado en el consumo de alcohol (Belfer *et al.*, 2007; Ash *et al.*, 2011; Ash *et al.*, 2014; Scheller *et al.*, 2017). Como GALR3 se encuentra principalmente restringido al hipotálamo y a la hipófisis (Smith *et al.*, 1998; Waters *et al.*, 2000) se ha propuesto que dichas áreas son cruciales para este efecto. En la presente invención se demuestra la importancia de los receptores GALR1 y GALR2 en la reducción de la preferencia y el consumo de etanol inducido por GAL(1-15) y se sugiere que el cuerpo estriado, una región clave en los efectos de recompensa de las drogas (Koob, 1992), está implicado en los efectos mediados por GAL(1-15). En este modelo de consumo voluntario de etanol, GAL(1-15) inducía un aumento significativo del ARNm de *C-Fos* y la expresión de *Rab5* en el cuerpo estriado, lo que indica una mejora de la activación neuronal, así como una internalización del receptor en esta área (Borrito-Escuela *et al.*, 2012). Es más, en estos animales, después de la inyección de GAL(1-15), se observó una reducción significativa de la expresión de GALR1 y un ligero descenso del ARNm de GALR2 en el cuerpo estriado, lo que sugiere que ambos receptores estriatales participaban en los efectos mediados por GAL(1-15) sobre la ingesta voluntaria de etanol en este núcleo. Curiosamente, la evidencia de que las inyecciones de etanol en animales no sometidos previamente a experimentación no tienen ningún efecto sobre la expresión de GALR1 y GALR2 en el cuerpo estriado, indica que el etanol propiamente dicho no influye en la expresión de GALR y confirma que los efectos a nivel de GALR de nuestro modelo fueron inducidos por GAL(1-15).

La importancia del cuerpo estriado como una diana para GAL(1-15) fue respaldada por la capacidad de GAL(1-15) para favorecer la supresión de la actividad locomotora inducida por el etanol. La supresión del etanol de la actividad locomotora después de la inyección i.p. de etanol resulta un efecto del comportamiento bien conocido mediado principalmente por el sistema dopaminérgico, donde se incluye el cuerpo estriado. En consecuencia, se ha demostrado que este efecto se reduce notablemente cuando se lesiona el sistema dopaminérgico usando 6-OHDA, lo que produce una reducción rápida de la dopamina en el cuerpo estriado (Breese *et al.*, 1984). La presente invención sugiere que la potenciación de la hipolocomoción inducida por GAL(1-15), en ratas tratadas con alcohol, puede necesitar de la modulación del sistema dopaminérgico a través de GAL(1-15), e incluyendo probablemente al cuerpo estriado ya que es una diana importante de las proyecciones dopaminérgicas.

Aunque previamente, el aumento de la ingesta de etanol de GAL se relacionó directamente con varias zonas dentro del hipotálamo (Leibowitz *et al.*, 2003; Rada *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2007), la invención actual sugiere que GAL(1-15) actúa a través del cuerpo estriado, una zona que posee puntos de unión específicos para GAL(1-15) (Hedlund *et al.*, 1992). La implicación del cuerpo estriado en la acción mediada por GAL(1-15) explicaría la diferente actuación entre GAL y GAL(1-15) en la ingesta de etanol.

Debe considerarse a la dopamina como un neurotransmisor diana implicado en la reducción del consumo de etanol por GAL(1-15). Apoyando esta hipótesis, GAL reduce la respuesta del comportamiento después del tratamiento con varias sustancias adictivas, como por ejemplo, morfina o anfetaminas, modulando principalmente la neurotransmisión dopaminérgica (Tsuda *et al.*, 1998; Pierce *et al.*, 2006) y la transmisión de dopamina tiene un papel principal en los efectos motores del alcohol en el cuerpo estriado (Brabant *et al.*, 2014).

Los resultados incluidos en la presente invención mostraron que GAL(1-15) disminuye el consumo voluntario de alcohol; sin embargo, debido a que se ha demostrado una correlación positiva entre la toma de alcohol y la autoadministración oral operante (Green and Grahame, 2008), podemos esperar que GAL(1-15) también puede disminuir la autoadministración de alcohol en ratas. De hecho, otros fármacos relacionados con neuropéptidos, como los antagonistas de ghrelina, reducían la preferencia de ingesta de etanol, así como la autoadministración operante de etanol (Gomez *et al.*, 2015). Además, no solo se ha demostrado que GAL(1-15) tiene funciones biológicas, otros fragmentos N-terminales de galanina, como GAL(1-16) poseen efectos biológicos. Así, GAL(1-16) puede aumentar sustancialmente los valores de K_d de los puntos de unión del agonista de 5HT_{1A} en la corteza límbica ventral de la rata, sin afectar a los valores de B_{max} (Diaz-Cabiale *et al.*, 2000), estos resultados son consistentes con otros trabajos donde GAL(1-15) reduce la afinidad del receptor 5HT_{1A} en el hipocampo dorsal sin afectar a los valores de B_{max} (Hedlund *et al.*, 1994). Por ello, los estudios funcionales han demostrado que varios fragmentos N-terminales de galanina parecen ejercer efectos similares (Diaz-Cabiale *et al.*, 2000).

En conclusión, la presente invención indica que GAL(1-15) induce una fuerte reducción en la preferencia y consumo de etanol en ratas, probablemente con la implicación del cuerpo

estriado, una región clave en los efectos de recompensa de las drogas, poniendo los cimientos para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas mediante el uso de análogos de GAL(1-15) para el tratamiento de TCA en humanos.

5 La presente invención proporciona así:

La presente invención se refiere al uso de GAL(1-15) o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, es decir, los compuestos de la invención, para prevenir y/o tratar trastornos y efectos relacionados con el alcohol,
10 especialmente a través de la reducción del consumo de alcohol.

GAL(1-15) o sus análogos pueden estar en su forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término «solvato», como se usa en el presente documento, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables; es decir solvatos que
15 pueden usarse en la fabricación de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, que pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre que sea farmacéuticamente aceptable. En una realización en particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse mediante métodos convencionales de solvatación
20 conocidos por aquellos expertos en la materia.

Para su uso en terapia, GAL(1-15) o sus análogos, o sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos o hidratos, estarían preferiblemente en una forma sustancialmente pura o farmacéuticamente aceptable, es decir, con un nivel de pureza aceptable farmacéuticamente
25 y excluyendo los aditivos farmacéuticos normales como diluyentes y vehículos, y sin incluir materiales considerados tóxicos a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo están preferiblemente por encima del 50%, más preferiblemente por encima del 70% y, aún, más preferiblemente por encima del 90%. En una realización preferida, son mayores del 95% en GAL(1-15) o sus análogos, o sus sales, ésteres,
30 tautómeros, solvatos o hidratos.

Los trastornos relacionados con el alcohol mencionados anteriormente incluyen intoxicación aguda, uso nocivo, síndrome de dependencia, estado de abstinencia y otros trastornos mentales y de comportamiento inducidos por el alcohol debido al consumo del mismo.

35

De acuerdo con el sistema de clasificación internacional de enfermedades (*International Classification of Diseases*, ICD-10), los trastornos mentales y de comportamiento debido al consumo de alcohol (F10) se clasifican en base al uso de sustancia psicoactiva (F10-F19) e incluyen las siguientes subsecciones: F10. Trastornos mentales y de comportamiento debidos al consumo de alcohol. F10.0. Intoxicación aguda. F10.1. Uso nocivo. F10.2. Síndrome de dependencia. F10.3. Estado de abstinencia. F10.4. Estado de abstinencia con delirio. F10.5. Trastorno psicótico. F10.6. Síndrome amnésico. F10.7. Trastorno psicótico de inicio tardío y residual. F10.8. Otros trastornos mentales y de comportamiento. F10.9. Otros trastornos mentales y de comportamiento inespecíficos.

10

La intoxicación aguda (F.10.0) es el estado transitorio posterior a la ingestión de alcohol que causa alteraciones a nivel de conciencia, capacidad intelectual, percepción, estado afectivo, comportamiento u otras funciones y respuestas psicológicas o fisiológicas. Incluye, entre otros, embriaguez aguda e intoxicación patológica.

15

El uso nocivo (F10.1) significa aquel en que la salud mental o física se ve afectada, sin cumplir por completo con los criterios de dependencia o ningún otro de los indicados dentro de F10.

20

El síndrome de dependencia (F.10.2) supone un conjunto de manifestaciones fisiológicas (síntomas somáticos, tolerancia), de comportamiento y cognitivos en los cuales el consumo de la sustancia supone la prioridad mayor para el individuo.

25

El estado de abstinencia (F10.3) supone un conjunto de síntomas somáticos y psicológicos que aparecen cuando existe una abstinencia relativa o absoluta de la sustancia después del consumo de dosis altas, normalmente prolongadas, y repetidas. Es uno de los indicadores de la presencia del síndrome de dependencia.

30

En una realización, el trastorno relacionado con el alcohol es embriaguez aguda o intoxicación patológica. Preferiblemente, los efectos ligados a la embriaguez aguda o la intoxicación patológica incluyen efecto sedante, descoordinación motora, confusión, neurodegeneración o cualquiera de sus combinaciones.

35

En otra realización, el trastorno relacionado con el alcohol es síndrome de dependencia o estado de abstinencia. Preferiblemente, los efectos ligados al síndrome de dependencia o al

estado de abstinencia incluyen, ansiedad, depresión, temblores, agitación y malestar, deterioro emocional o cognitivo compuesto por estado de ánimo negativo, anhedonia o problemas de memoria; tolerancia o incapacidad para controlar el consumo de alcohol; neuroinflamación, neurotoxicidad, muerte neuronal o cualquiera de sus combinaciones.

5

En el presente documento «alcohol» se entiende, principalmente, aunque no exclusivamente, como bebidas alcohólicas que contienen etanol. También es posible que otros tipos de alcoholes puedan causar los mismos síntomas tras su ingestión.

10 En una realización, la presente invención se refiere al uso de GAL(1-15) o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar trastornos y efectos relacionados con el alcohol, especialmente a través de la reducción del consumo de alcohol, como una composición farmacéutica que comprende GAL(1-15) o un análogo de la misma,
15 o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica consta de GAL(1-15) o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, aunque dicha composición farmacéutica pueda comprender opcionalmente vehículos y/o diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

20

Finalmente, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de trastornos y efectos relacionados con el alcohol, en particular con un procedimiento para la reducción del consumo de alcohol, que comprende la administración de GAL(1-15) o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato
25 farmacéuticamente aceptable, o una composición farmacéutica que comprende GAL(1-15) o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el uso es preventivo y la administración de un compuesto de la
30 invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, se lleva a cabo antes de la ingestión de alcohol o de cualquiera de sus derivados. En otra realización, el uso es preventivo y la administración de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, se realiza durante la ingestión de alcohol o de cualquiera de sus derivados. En otra realización, el uso es para
35 el tratamiento y la administración de un compuesto de la invención, o una composición

farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, se realiza durante la ingestión de alcohol o de cualquiera de sus derivados. En otra realización, el uso es para el tratamiento y la administración de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, se realiza después de la ingestión de alcohol o de cualquiera de sus derivados.

El compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, puede ser administrado junto con otro principio activo en una combinación simultánea o secuencial.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, se combina una cantidad apropiada del/los principio(s) activo(s), en forma de sal o en forma de base, en una mezcla íntima con un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede adquirir una gran variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran deseablemente en una forma de dosificación unitaria adecuada para administración por vía nasal, oral, rectal, percutánea o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, al preparar las composiciones en forma de dosificación oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y otros en el caso de las preparaciones líquidas orales como las suspensiones, los jarabes, los elixires y las soluciones; o vehículos sólidos como almidones, azúcares, caolina, lubricantes, aglutinantes, disgregantes y similares en el caso de polvos, pastillas, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se utilizan, obviamente, vehículos farmacéuticos sólidos.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en formas unitarias de dosificación para una administración fácil y uniformidad de dosis. Tal y como se usa en las especificaciones y reivindicaciones, la forma de dosificación unitaria se refiere a unidades físicamente separadas y adecuadas como dosis unitarias, en la que cada unidad contiene una cantidad predeterminada de principio(s) activo(s) calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Son ejemplos de estas formas unitarias de dosificación los comprimidos (incluyendo los comprimidos recubiertos o ranurados), las cápsulas, las pastillas, bolsas de polvos, obleas, soluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas de café, cucharadas soperas y otros, y múltiples segregados de los mismos.

El compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, puede administrarse antes, durante o después de la administración del otro principio activo, preferiblemente después de la administración del inhibidor de recaptación de serotonina, siempre que el tiempo entre la administración del compuesto de la invención, o la composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, y la administración del otro principio activo sea tal que se permite a los principios actuar sinérgicamente en el SNC. Cuando se prevea una administración simultánea, puede ser particularmente conveniente una composición que contenga tanto el compuesto de la invención como el otro principio activo. O el compuesto de la invención, o la composición farmacéutica que comprenda un compuesto de la invención, y el otro principio activo, pueden administrarse por separado en forma de composiciones adecuadas. Las composiciones pueden prepararse como se describe anteriormente.

La presente invención también comprende productos que contienen el compuesto de la invención, o la composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, y el otro principio activo como una preparación de combinación para un uso simultáneo, independiente o secuencial, separado o en la prevención o el tratamiento de los trastornos y efectos relacionados con el alcohol disminuyendo, especialmente, el consumo de alcohol. Estos productos pueden comprender, por ejemplo, un kit que comprende formas de dosificación unitarias independientes que contienen el compuesto de la invención, o la composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, y formas de dosificación unitarias separadas que contienen el principio activo, todo ello contenido en el mismo paquete o envase, por ejemplo, en un blíster.

Tal y como se usa en esta invención, el término «principio activo», «sustancia activa», «sustancia o sustancia farmacéuticamente activa» o «principio farmacéuticamente activo» significa cualquier componente que potencialmente proporcione un efecto farmacológico u otro tipo en el diagnóstico, curación, paliación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo humano o de otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la fabricación del fármaco y que están presentes en él en una forma modificada y prevista que proporciona una actividad o efecto específico.

La invención anteriormente mencionada se detalla adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes y meramente ilustrativos.

EJEMPLOS**MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS****5 Animales**

Las ratas macho Sprague Dawley (peso corporal de 225 a 250 g, 8 semanas de edad) se obtuvieron de Criffa y se mantuvieron en una estancia con la humedad y temperatura controladas (20–22 °C). Las ratas del paradigma de elección entre dos botellas se mantuvieron durante todo el protocolo, con ciclos de luz/oscuridad invertidos de 12 horas (sin luz a partir de las 10 de la mañana) mientras que las otras ratas se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los animales tenían acceso libre a *pellets* de pienso y a agua corriente. Toda experimentación animal se llevó a cabo de acuerdo con las directrices para el cuidado y utilización de animales de laboratorio de la Universidad de Málaga.

Inyecciones intracerebroventriculares

Este protocolo se ha utilizado previamente (Diaz-Cabiale *et al.*, 2011; Millon *et al.*, 2015). Brevemente, las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con Equitesin (3,3 ml/kg de peso corporal), y se les implantó de forma estereotáctica una cánula guía de acero inoxidable de calibre 22 unilateral crónica dentro del ventrículo cerebral lateral derecho usando las coordenadas siguientes: 1,4 mm lateral y 1 mm posterior al bregma, y 3,6 mm por debajo de la superficie del cráneo (Paxinos, 1986). Después de la cirugía, los animales se alojaron individualmente y se les dejó un periodo de recuperación de 7 días. Las inyecciones en el ventrículo lateral se realizaron usando una cánula de inyección de acero inoxidable de calibre 26 conectada a través de un tubo PE-10 a una jeringuilla de Hamilton. El volumen total fue de 5 µl por inyección y el tiempo de infusión de 1 minuto.

Las soluciones fueron preparaciones recientes y los péptidos se disolvieron en líquido cefalorraquídeo artificial (composición de NaCl 120 nM, NaH₂CO₃ 20 nM, KCl 2 nM, KH₂PO₄ 0,5 nM, CaCl₂ 1,2 nM, MgCl₂ 1,8 nM, Na₂SO₄ 0,5 nM y D-glucosa 5,8 nM, pH de 7,4). GAL se obtuvo de NeoMPS, Estrasburgo, Francia; GAL(1-15) y el antagonista M871 del receptor GALR2 se obtuvieron de Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido.

Prueba de elección entre dos frascos para preferencia y consumo voluntario de etanol

La prueba de elección entre dos frascos se usó para determinar el consumo voluntario de etanol de las ratas tal y como se describió previamente (Castilla-Ortega *et al.*, 2016). Brevemente, después de 7 días de consumo de agua (ambos frascos), se ofreció la elección entre agua y concentraciones crecientes de etanol [3, 6 y 10 % (v/v)] durante 7 días para cada una. La elección entre etanol al 10 % (v/v) y agua se ofreció durante varios días hasta que se alcanzó un valor inicial estable. Se registró diariamente el consumo de agua y etanol. Se cambió la posición de los frascos cada día para evitar la preferencia por ubicación. Se calculó la ingesta de agua (g/kg), la ingesta de etanol (g/kg) y la preferencia (consumo de etanol/consumo total de líquido [agua más etanol] x 100)) para cada animal. Durante todo el experimento, se calcularon la evaporación y salpicaduras estimadas usando una jaula vacía con dos frascos, uno con agua y el otro con la solución apropiada de etanol. En los experimentos, se ofreció la elección entre etanol (al 10%) y agua.

Se realizaron tres grupos de experimentos con el paradigma de elección entre dos frascos. En el primer grupo de experimentos, se llevó a cabo la curva dosis-respuesta de GAL(1-15). Para esto, los grupos de ratas recibieron por vía i.c.v. 1 nmol o 3 nmol de GAL(1-15) o vehículo 2, 14 y 24 horas antes de las mediciones. En el segundo grupo de experimentos, se compararon los efectos de la prueba de elección entre dos frascos para GAL y GAL(1-15). Para esto, los grupos de ratas recibieron por vía i.c.v. 3 nmol de GAL, 3 nmol de GAL(1-15) o vehículo, 2, 14 y 24 horas antes de la prueba. En el último grupo de experimentos, se estudió la función de GALR2 para esto, los grupos de ratas recibieron por vía i.c.v. 3 nmol de GAL(1-15) combinados con 3 nmol del antagonista M871 de GALR2 2 horas antes de las mediciones.

En la Fig. 1 se muestra el esquema general del diseño experimental.

Expresión del ARNm de los receptores de galanina, genes *C-Fos* y *Rab5* en el cuerpo estriado durante el consumo voluntario de etanol.

Los grupos de ratas del paradigma de elección entre dos frascos fueron decapitados 2 horas después de la administración por vía i.c.v. de 3 nmol de GAL(1-15) o vehículo y el cuerpo estriado se diseccionó y congeló en CO₂ sólido hasta el análisis de expresión del ARNm.

Aislamiento de ARN y análisis cuantitativo mediante PCR en tiempo real

El procedimiento para realizar el aislamiento del ARN y la RT-PCR se ha descrito previamente (Millon *et al.*, 2015). Se aisló el ARN total del cuerpo estriado mediante el kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADNc se obtuvo mediante el kit Reverse Transcriptase Core (Eurogentec, Seraing, Bélgica). Estos pasos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Todos los análisis mediante PCR se realizaron por triplicado usando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.) en el sistema 7500 RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). Las secuencias de los cebadores usadas en este estudio son:

GAPDH-Directo: 5'-GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTC;

GAPDH-Inverso: 5'-GAGGCTGGCACTGCACAA;

GALR1-Directo: 5'-AAAACTGGACAAAAGCTTAGCC;

GALR1-Inverso: 5'-GGATACCTTTGTCTTTGCTC;

GALR2-Directo: 5'-AACAGGAATCCACAGACC;

GALR2-Inverso: 5'-CCCTTTGGTCCTTTAACAAG ;

C-FOS-Directo: 5'-AAACGGAGAATCCGAAGG;

C-FOS-Inverso: 5'-CGTCTTCAAGTTGATCTGTC;

RAB5-Directo: 5'-AAAAGAGCTGTTGACTTCC;

RAB5-Inverso: 5'-AGGTCTACTCCTCTTCCTC.

Los datos se analizaron mediante el método comparativo Ct y se normalizaron con respecto a las mediciones del ARNm de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Ensayo de la enzima alcohol deshidrogenasa

Se analizó la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) citosólica hepática en las ratas de la prueba de elección entre dos frascos. La actividad de la ADH tiene una buena correlación con las tasas de eliminación de etanol *in vivo* (Lumeng *et al.*, 1979) y la administración de etanol crónica provoca un aumento en la actividad de la ADH (Buris *et al.*, 1985).

Se extrajeron los hígados 2 horas después de las inyecciones i.c.v. y se congelaron en CO₂ sólido hasta su utilización. La determinación de la actividad de la ADH se realizó en tejido

hepático homogeneizado en una solución de TrisHCl (10 mM, pH = 8,8; ditioneitol 0,5 mM) centrifugado a 12,000g durante 10 minutos. La actividad de la ADH se evaluó usando un microensayo adaptado al analizador Cobas Mira según Shephard y colaboradores (Shephard *et al.*, 1987). Brevemente, se añadieron 300 µl de solución de NAD (2,9 mM en Glicina 0,1 M/NaOH; p = 10) a 30 µl de muestra. La primera lectura óptica se registró antes de la adición de 20 µl de etanol 17 mM y, después, se siguió la velocidad de cambio en la absorción del cromógeno NADH a 340 nm con el tiempo con un analizador Cobas Mira a 37 °C. Una unidad de actividad se definió como la reducción de 1 mol de NAD a NADH/min a 37 °C.

Experimentos de actividad locomotora

En este experimento se investigaron los efectos de GAL(1-15) (3 nmol) sobre la locomoción reducida por etanol (1,75 g/kg; intraperitoneal (i.p.)) (Vallof *et al.*, 2016). La actividad locomotora se registró en campo abierto para ratas (100 x 100 x 50 cm) donde los animales fueron colocados individualmente y se les dejó explorar libremente. Su comportamiento se registró durante un periodo de 30 minutos mediante una videocámara colocada en el techo, y la actividad locomotora se analizó mediante el *software* de seguimiento de objetos EthovisionXT. Después de cada ensayo, se limpiaron todas las superficies con un papel absorbente y solución de etanol al 70%. Para la actividad locomotora, se registraron la distancia total recorrida (cm) y la velocidad media (cm/s). Se administró a los grupos de ratas GAL(1-15) o vehículo por vía i.c.v. 20 minutos antes de la prueba; la administración de etanol i.p. (1,75 g/kg) o solución salina se realizó 5 minutos antes de la prueba.

Expresión del ARNm de *GALR1* y *GALR2* después de la administración aguda de etanol

Se inyectaron grupos de ratas no tratadas experimentalmente con anterioridad con etanol i.p. a 4g/kg (Bilbao *et al.*, 2016), disuelto en una solución salina estéril al 0,9 % (p/v), y 0, 2 y 4 horas después de la inyección se extrajeron los cerebros tras una rápida decapitación. Se extrajeron rápidamente los cuerpos estriados de todos los animales y se congelaron inmediatamente en CO₂ sólido hasta su utilización. El procedimiento para realizar el aislamiento del ARN y la RT-PCR se ha descrito previamente.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como las medias $\pm$ error estándar de la media y los números de la muestra (n) se indican en las leyendas de la figuras. Todos los datos se analizaron mediante GraphPad PRISM 4.0 (*software* GraphPad). Para comparar dos condiciones experimentales, se realizaron análisis estadísticos mediante la prueba de la *t* de Student no pareada. En caso contrario, se realizaron análisis de varianza unidireccional (ANOVA) o ANOVA bidireccionales seguidas de pruebas posteriores de comparación de LSD de Fisher. Las diferencias eran significativas con $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Ejemplo 1. Actividad de la ADH en hígado en el consumo voluntario de etanol

La ingesta voluntaria de etanol a través del protocolo de la prueba de elección entre dos frascos indujo un aumento significativo en la actividad de la ADH en comparación con el grupo inicial ($t_{11} = 3,281$ $p < 0,01$), lo que confirmó la validez de nuestro modelo (Tabla 1).

Actividad de la ADH		
Tratamiento	<i>Valor inicial</i>	<i>Vehículo/EtOH</i>
ADH (proteína UI/g)	251,4 $\pm$ 14,8	313,1 $\pm$ 10,6**

Tabla 1. Actividad de la ADH en el hígado de animales del paradigma de elección entre dos frascos. Efectos de la ingestión voluntaria de etanol en animales de la prueba de elección entre dos frascos sobre la actividad de la ADH en el hígado. Se utilizaron como grupo vehículo ratas inyectadas con líquido cefalorraquídeo y como grupo inicial las ratas con las que no se había experimentado previamente. Los datos representan la media $\pm$ EEM (n = 6-7 animales por grupo). ** $p < 0,01$ frente al grupo de referencia de acuerdo a la prueba *t* de Student.

Ejemplo 2. GAL(1-15) inducía una disminución de la ingesta de etanol y la preferencia de alcohol en el paradigma de elección entre dos frascos

GAL(1-15) a 3 nmol disminuía significativamente la ingesta de etanol a las 2 horas (ANOVA unidireccional, $F_{2,30} = 3,54$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 2a), a las 14 horas (ANOVA unidireccional, $F_{2,30} = 3,44$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 2b) y a las 24 horas (ANOVA unidireccional, $F_{2,29} = 3,59$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 2c) después de su administración. GAL(1-15) a una dosis de 1 nmol no tenía efecto sobre la ingesta de etanol en todos los puntos temporales analizados.

Adicionalmente, 2 horas después de la administración i.c.v. de 3 nmol de GAL(1-15), se observó una disminución significativa del 90% en la preferencia por etanol (ANOVA unidireccional, $F_{2,31} = 3,46$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 2g). Este efecto se mantenía durante 24 horas (ANOVA unidireccional, $F_{2,31} = 3,57$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 2i). De nuevo, la dosis de 1 nmol de GAL(1-15) no tenía efectos sobre la preferencia por etanol.

En la ingesta de agua (Fig. 2d,e,f) y pienso (Fig. 2j,k,l), no se hallaron diferencias en ningún punto temporal posterior a la administración por vía i.c.v. de GAL(1-15) a cualquier dosis.

Estos resultados indican que GAL(1-15) provoca una fuerte disminución de la preferencia e ingesta de alcohol en ratas.

Ejemplo 3. Comparación entre GAL y GAL(1-15) en el paradigma de elección entre dos frascos.

En la ingesta de etanol, el análisis ANOVA unidireccional global mostró una diferencia significativa entre GAL y el fragmento N-terminal GAL(1-15) a las 2, 14 y 24 horas tras los tratamientos. Dos horas después de la inyección, GAL(1-15) disminuía significativamente la ingesta de etanol en comparación con GAL (ANOVA unidireccional, $F_{2,31} = 4,208$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,01$; Fig. 3a). Se observó el mismo patrón de respuesta en los demás puntos temporales, GAL(1-15) disminuía significativamente la ingesta de etanol frente a los grupos de GAL 14 (ANOVA unidireccional, $F_{2,30} = 3,97$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 3b) y 24 horas (ANOVA unidireccional, $F_{2,30} = 2,53$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 3c) después de la inyección i.c.v.

En cuanto a la preferencia por etanol, se volvió a observar la diferencia entre GAL y GAL(1-

15). GAL(1-15) disminuía la preferencia por etanol en comparación con GAL, 2 horas después de su administración (ANOVA unidireccional, $F_{2,30} = 3,55$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 3g), efecto que se mantenía 24 horas después (ANOVA unidireccional, $F_{2,32} = 3,43$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 3i).

5

GAL no tiene efecto sobre la preferencia e ingesta de etanol en comparación con el vehículo en cualquier punto temporal (Fig. 3).

No se encontraron diferencias entre GAL y el fragmento GAL(1-15) en la ingesta de agua (Fig. 3d, e, f) ni en la ingesta de pienso (Fig. 3j, k, l).

10

Ejemplo 4. Efectos mediados por GAL(1-15) bloqueados por el antagonista M871 del receptor GALR2 en el paradigma de elección entre dos frascos.

En la prueba de elección entre dos frascos, el antagonista M871 de GALR2 bloqueaba significativamente la disminución en la ingesta de etanol (ANOVA unidireccional, $F_{2,34} = 3,72$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 4a) inducida por GAL(1-15) 2 horas después de su administración.

15

En cuanto a la preferencia por etanol, se observó el mismo tipo de cambio. Así, GALR2 participaba en el efecto mediado por GAL(1-15), ya que el antagonista M871 de GALR2 bloqueaba significativamente la disminución en la preferencia por etanol inducida por GAL(1-15) (ANOVA unidireccional, $F_{2,32} = 3,39$ $p < 0,05$, prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,05$; Fig. 4c).

20

25

El antagonista M871 de GALR2 aislado a una dosis de 3 nmol no tenía efecto sobre la ingesta de etanol ($0,13 \pm 0,06$ g/kg) ni sobre la preferencia por etanol ($12,65 \pm 8,23\%$).

Ni la ingesta de agua (Fig. 4b) ni la de pienso (Fig. 4d) se modificaron con M871 (ingesta de agua: $8,26 \pm 2,00$ g/kg; ingesta de pienso: $6,67 \pm 0,95$ g) o GAL(1-15)+M871 2 horas después de la inyección.

30

Ejemplo 5. Efectos de GAL(1-15) sobre la expresión del ARNm de los receptores de galanina y sobre los genes C-Fos y Rab5 del cuerpo estriado en el consumo voluntario de etanol.

35

Como se muestra en la Fig. 5, GAL(1-15) a una dosis de 3 nmol producía un aumento significativo en los niveles de ARNm de los genes *C-Fos* ($t_8 = 5,488$ $p < 0,001$; Fig. 5a) y *Rab5* ($t_6 = 4,148$ $p < 0,01$; Fig. 5b) en la prueba de elección entre dos frascos 2 horas después de su administración.

5

La administración de GAL(1-15) también modificaba la expresión de los receptores GALR1 y GALR2 en el cuerpo estriado, lo que producía una disminución significativa de los niveles del ARNm de *GALR1*, ($t_{10} = 2,341$ $p < 0,05$; Fig. 5c) y una ligera reducción en la expresión de *GALR2*, ($t_{10} = 1,360$ $p = 0,101$; Fig. 5d), lo que sugiere la implicación de ambos receptores en los efectos de GAL(1-15).

10

Ejemplo 6. Efectos de GAL(1-15) sobre la locomoción reducida por etanol

Como se describió anteriormente, la administración i.p. de etanol a 1,75 g/kg reducía la distancia recorrida (ANOVA unidireccional, $F_{1,25} = 62,2$ $p < 0,001$) y la velocidad media (ANOVA unidireccional, $F_{1,25} = 62,2$ $p < 0,001$) cinco minutos después de su administración (Fig. 6).

15

El efecto de la dosis de 3 nmol de GAL(1-15) sobre la locomoción (distancia recorrida y velocidad media), dependía del etanol i.p. (distancia recorrida: ANOVA bidireccional para la interacción alcohol/tratamiento i.c.v.; $F_{1,25} = 7,19$ $p < 0,01$; velocidad media: ANOVA bidireccional para la interacción alcohol/tratamiento i.c.v.; $F_{1,25} = 7,19$ $p < 0,01$) (Fig. 6). Por tanto, en las ratas tras la administración i.p. de etanol, GAL(1-15) disminuía la distancia recorrida (prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p < 0,001$; Fig. 6a), mientras que no se observaron estos efectos en las ratas con administración sistémica de solución salina (prueba LSD de Fisher *post hoc*: $p = 0,71$; Fig. 6a). De forma similar a la distancia recorrida, GAL(1-15) disminuía la velocidad media exclusivamente en las ratas tratadas sistémicamente con etanol (prueba LSD de Fisher: $p < 0,001$; Fig. 6b).

20

25

Ejemplo 7. Expresión de GALR1 y GALR2 en el cuerpo estriado después de la administración aguda de etanol

Para determinar si el etanol influía en la expresión de GALR1 y GALR2 en el cuerpo estriado, evaluamos los efectos en la administración aguda de etanol sobre los niveles del ARNm de *GALR1* y *GALR2* en el cuerpo estriado a las 2 y a las 4 horas.

35

Como se muestra en la Tabla 2, una única inyección de etanol (4g/kg i.p.) no tenía efecto sobre la expresión de *GALR1* en el cuerpo estriado a las 2 y a las 4 horas de la administración (ANOVA unidireccional, $F_{2,14} = 1,19$ $p = 0,24$).

5

Tiempo tras la inyección i.p. de EtOH (4g/kg)			
Expresión de ARNm	0 horas	2 horas	4 horas
<i>GALR1</i>	0,87±0,2	0,60±0,1	0,47±0,1
<i>GALR2</i>	1,21±0,1	1,23±0,1	1,44±0,1

Tabla 2. Efectos de la administración de etanol sobre la expresión de *GALR1* y *GALR2* en el cuerpo estriado. Los efectos de la administración aguda i.p. de EtOH (4 g/kg) sobre la expresión del ARNm de *GALR1* y *GALR2* en el cuerpo estriado se midieron a las 0, 2 y 4 horas tras la inyección. Los datos representan la media ± EEM (n = 4-8 animales por grupo). No se encontraron diferencias significativas mediante el análisis ANOVA unidireccional.

10

Tampoco se observaron efectos sobre los niveles del ARNm de *GALR2* en ningún punto temporal (ANOVA unidireccional, $F_{2,14} = 1,15$ $p = 0,34$).

15

Referencias

Ash BL, Zanatta SD, Williams SJ, Lawrence AJ, Djouma E (2011). The galanin-3 receptor antagonist, SNAP 37889, reduces operant responding for ethanol in alcohol-preferring rats. *Regul Pept* 166: 59-67.

20

Ash BL, Quach T, Williams SJ, Lawrence AJ, Djouma E (2014). Galanin-3 receptor antagonism by SNAP 37889 reduces motivation to self-administer alcohol and attenuates cue-induced reinstatement of alcohol-seeking in iP rats. *Journal of pharmacological sciences*

125: 211-216.

Belfer I, Hipp H, Bollettino A, McKnight C, Evans C, Virkkunen M, *et al.* (2007). Alcoholism is associated with GALR3 but not two other galanin receptor genes. *Genes, brain, and behavior* 6: 473-481.

Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavon FJ, Giuffrida A, Suarez J, *et al.* (2016). Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addiction biology* 21: 859-872.

Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Mudo G, Perez-Alea M, Ciruela F, Tarakanov AO, *et al.* (2012). Fibroblast growth factor receptor 1- 5-hydroxytryptamine 1A heteroreceptor complexes and their enhancement of hippocampal plasticity. *Biol Psychiatry* 71: 84-91.

Brabant C, Guarnieri DJ, Quertemont E (2014). Stimulant and motivational effects of alcohol: lessons from rodent and primate models. *Pharmacol Biochem Behav* 122: 37-52.

Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW (2000). Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21: 109-117.

Breese GR, Baumeister AA, McCown TJ, Emerick SG, Frye GD, Crotty K, *et al.* (1984). Behavioral differences between neonatal and adult 6-hydroxydopamine-treated rats to dopamine agonists: relevance to neurological symptoms in clinical syndromes with reduced brain dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 231: 343-354.

Buris L, Csabai G, Fodor M, Varga M (1985). Increase of alcohol dehydrogenase and protein content of liver following chronic ethanol administration. *FEBS Lett* 183: 143-144.

Castilla-Ortega E, Pavon FJ, Sanchez-Marin L, Estivill-Torrus G, Pedraza C, Blanco E, *et al.* (2016). Both genetic deletion and pharmacological blockade of lysophosphatidic acid LPA1 receptor results in increased alcohol consumption. *Neuropharmacology* 103: 92-103.

Chappell AM, Carter E, McCool BA, Weiner JL (2013). Adolescent rearing conditions influence the relationship between initial anxiety-like behavior and ethanol drinking in male Long Evans rats. *Alcohol Clin Exp Res* 37 Suppl 1: E394-403.

Diaz-Cabiale Z, Parrado C, Vela C, Razani H, Covenas R, Fuxe K, *et al.* (2005). Role of galanin and galanin(1-15) on central cardiovascular control. *Neuropeptides* 39: 185-190.

Diaz-Cabiale Z, Parrado C, Narvaez M, Millon C, Puigcerver A, Fuxe K, *et al.* (2010).
5 Neurochemical modulation of central cardiovascular control: the integrative role of galanin. *EXS* 102: 113-131.

Diaz-Cabiale Z, Parrado C, Narvaez M, Puigcerver A, Millon C, Santin L, *et al.* (2011).
10 Galanin receptor/Neuropeptide Y receptor interactions in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology* 61: 80-86.

Flores-Burgess A, Millon C, Gago B, Narvaez M, Borroto-Escuela DO, Mengod G, *et al.*
(2017). Galanin (1-15) enhancement of the behavioral effects of Fluoxetine in the forced
15 swimming test gives a new therapeutic strategy against depression. *Neuropharmacology*
118: 233-241.

Fuxe K, Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Tarakanov AO, Calvo F, Garriga P, *et al.*
(2012). On the existence and function of galanin receptor heteromers in the central
nervous system. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 127.

20 Fuxe K, Marcellino D, Rivera A, Diaz-Cabiale Z, Filip M, Gago B, *et al.* (2008). Receptor-
receptor interactions within receptor mosaics. Impact on neuropsychopharmacology. *Brain*
Res Rev 58: 415-452.

25 Hedlund PB, Fuxe K (1996). Galanin and 5-HT_{1A} receptor interactions as an integrative
mechanism in 5-HT neurotransmission in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 780: 193-212.

Hedlund PB, Yanaihara N, Fuxe K (1992). Evidence for specific N-terminal galanin fragment
binding sites in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 224: 203-205.

30 Jacobowitz DM, Kresse A, Skofitsch G (2004). Galanin in the brain: chemoarchitectonics and
brain cartography--a historical review. *Peptides* 25: 433-464.

Karatayev O, Baylan J, Leibowitz SF (2009). Increased intake of ethanol and dietary fat in
35 galanin overexpressing mice. *Alcohol* 43: 571-580.

- Karatayev O, Baylan J, Weed V, Chang S, Wynick D, Leibowitz SF (2010). Galanin knockout mice show disturbances in ethanol consumption and expression of hypothalamic peptides that stimulate ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 34: 72-80.
- 5
- Koob GF (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13: 177-184.
- Lang R, Gundlach AL, Holmes FE, Hobson SA, Wynick D, Hokfelt T, *et al.* (2015). Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity. *Pharmacological reviews* 67: 118-175.
- 10
- Leeman RF, Heilig M, Cunningham CL, Stephens DN, Duka T, O'Malley SS (2010). Ethanol consumption: how should we measure it? Achieving consilience between human and animal phenotypes. *Addiction biology* 15: 109-124.
- 15
- Leibowitz SF, Avena NM, Chang GQ, Karatayev O, Chau DT, Hoebel BG (2003). Ethanol intake increases galanin mRNA in the hypothalamus and withdrawal decreases it. *Physiol Behav* 79: 103-111.
- 20
- Lewis MJ, Johnson DF, Waldman D, Leibowitz SF, Hoebel BG (2004). Galanin microinjection in the third ventricle increases voluntary ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 1822-1828.
- Lewis MJ, Rada P, Johnson DF, Avena NM, Leibowitz SF, Hoebel BG (2005). Galanin and alcohol dependence: neurobehavioral research. *Neuropeptides* 39: 317-321.
- 25
- Lumeng L, Bosron WF, Li TK (1979). Quantitative correlation of ethanol elimination rates in vivo with liver alcohol dehydrogenase activities in fed, fasted and food-restricted rats. *Biochem Pharmacol* 28: 1547-1551.
- 30
- Marcinkiewicz CA, Lowery-Gionta EG, Kash TL (2016). Serotonin's Complex Role in Alcoholism: Implications for Treatment and Future Research. *Alcohol Clin Exp Res* 40: 1192-1201.
- 35
- Millon C, Flores-Burgess A, Narvaez M, Borroto-Escuela DO, Santin L, Parrado C, *et al.*

(2015). A role for galanin N-terminal fragment (1-15) in anxiety- and depression-related behaviors in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 18: 1-13.

Millon C, Flores-Burgess A, Narvaez M, Borroto-Escuela DO, Santin L, Gago B, *et al.* (2016). Galanin (1-15) enhances the antidepressant effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT: involvement of the raphe-hippocampal 5-HT neuron system. *Brain Struct Funct.*

Millon C, Flores-Burgess A, Narvaez M, Borroto-Escuela DO, Gago B, Santin L, *et al.* (2017). The neuropeptides Galanin and Galanin(1-15) in depression-like behaviours. *Neuropeptides.*

Mitsukawa K, Lu X, Bartfai T (2008). Galanin, galanin receptors and drug targets. *Cell Mol Life Sci* 65: 1796-1805.

Paxinos G (1986). *The rat Brain in the stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press edn.

Picciotto MR (2008). Galanin and addiction. *Cell Mol Life Sci* 65: 1872-1879.

Picciotto MR, Brabant C, Einstein EB, Kamens HM, Neugebauer NM (2010). Effects of galanin on monoaminergic systems and HPA axis: Potential mechanisms underlying the effects of galanin on addiction- and stress-related behaviors. *Brain Res* 1314: 206-218.

Pierce RC, Kumaresan V (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* 30: 215-238.

Rada P, Mark GP, Hoebel BG (1998). Galanin in the hypothalamus raises dopamine and lowers acetylcholine release in the nucleus accumbens: a possible mechanism for hypothalamic initiation of feeding behavior. *Brain Res* 798: 1-6.

Rada P, Avena NM, Leibowitz SF, Hoebel BG (2004). Ethanol intake is increased by injection of galanin in the paraventricular nucleus and reduced by a galanin antagonist. *Alcohol* 33: 91-97.

Scheller KJ, Williams SJ, Lawrence AJ, Djouma E (2017). The galanin-3 receptor antagonist, SNAP 37889, suppresses alcohol drinking and morphine self-administration in mice.

Neuropharmacology 118: 1-12.

Schneider ER, Rada P, Darby RD, Leibowitz SF, Hoebel BG (2007). Orexigenic peptides and alcohol intake: differential effects of orexin, galanin, and ghrelin. *Alcohol Clin Exp Res* 31: 1858-1865.

Shephard MD, Penberthy LA, Berry MN (1987). Adaptation of methods for glutamate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase activities to a centrifugal analyser: assessment of their clinical use in anoxic states of the liver. *J Clin Pathol* 40: 1240-1246.

Simms JA, Steensland P, Medina B, Abernathy KE, Chandler LJ, Wise R, *et al.* (2008). Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res* 32: 1816-1823.

Smith KE, Walker MW, Artymyshyn R, Bard J, Borowsky B, Tamm JA, *et al.* (1998). Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 273: 23321-23326.

Tarragon E, Balino P, Aragon CM, Pastor R (2012). Ethanol drinking-in-the-dark facilitates behavioral sensitization to ethanol in C57BL/6J, BALB/cByJ, but not in mu-opioid receptor deficient CXBK mice. *Pharmacol Biochem Behav* 101: 14-23.

Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, McDonald TJ, Mutt V (1983). Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164: 124-128.

Tsuda K, Tsuda S, Nishio I, Masuyama Y, Goldstein M (1998). Effects of galanin on dopamine release in the central nervous system of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *American journal of hypertension* 11: 1475-1479.

Vallof D, Ulenius L, Egecioglu E, Engel JA, Jerlhag E (2016). Central administration of the anorexigenic peptide neuromedin U decreases alcohol intake and attenuates alcohol-induced reward in rodents. *Addiction biology*.

Waters SM, Krause JE (2000). Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 95: 265-271.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, para su uso en la reducción del consumo de alcohol.
2. Un compuesto para su uso en la reducción del consumo de alcohol según la reivindicación 1 en la que dicho compuesto es galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable.
3. Un compuesto para su uso en la reducción del consumo de alcohol según la reivindicación 2 en la que dicho compuesto es galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA.
4. Un compuesto para su uso en la reducción del consumo de alcohol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en las que dicho compuesto se utiliza en la preparación de una composición farmacéutica para su uso en reducción del consumo de alcohol.
5. Una composición farmacéutica que comprende galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, para su uso en la reducción del consumo de alcohol.
6. Una composición farmacéutica que comprende galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, para su uso en la reducción del consumo de alcohol.
7. Una composición farmacéutica que comprende galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, para su uso en la reducción del consumo de alcohol.
8. Un kit que comprende galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-

Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, o un análogo de la misma, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, para su uso en la reducción del consumo de alcohol.

- 5 9. Un kit que comprende galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, o su sal, éster, tautómero, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable, para su uso en la reducción del consumo de alcohol.
- 10 10. Un kit que comprende galanina(1-15), que tiene la fórmula general Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA, para su uso en la reducción del consumo de alcohol.



Figura 1

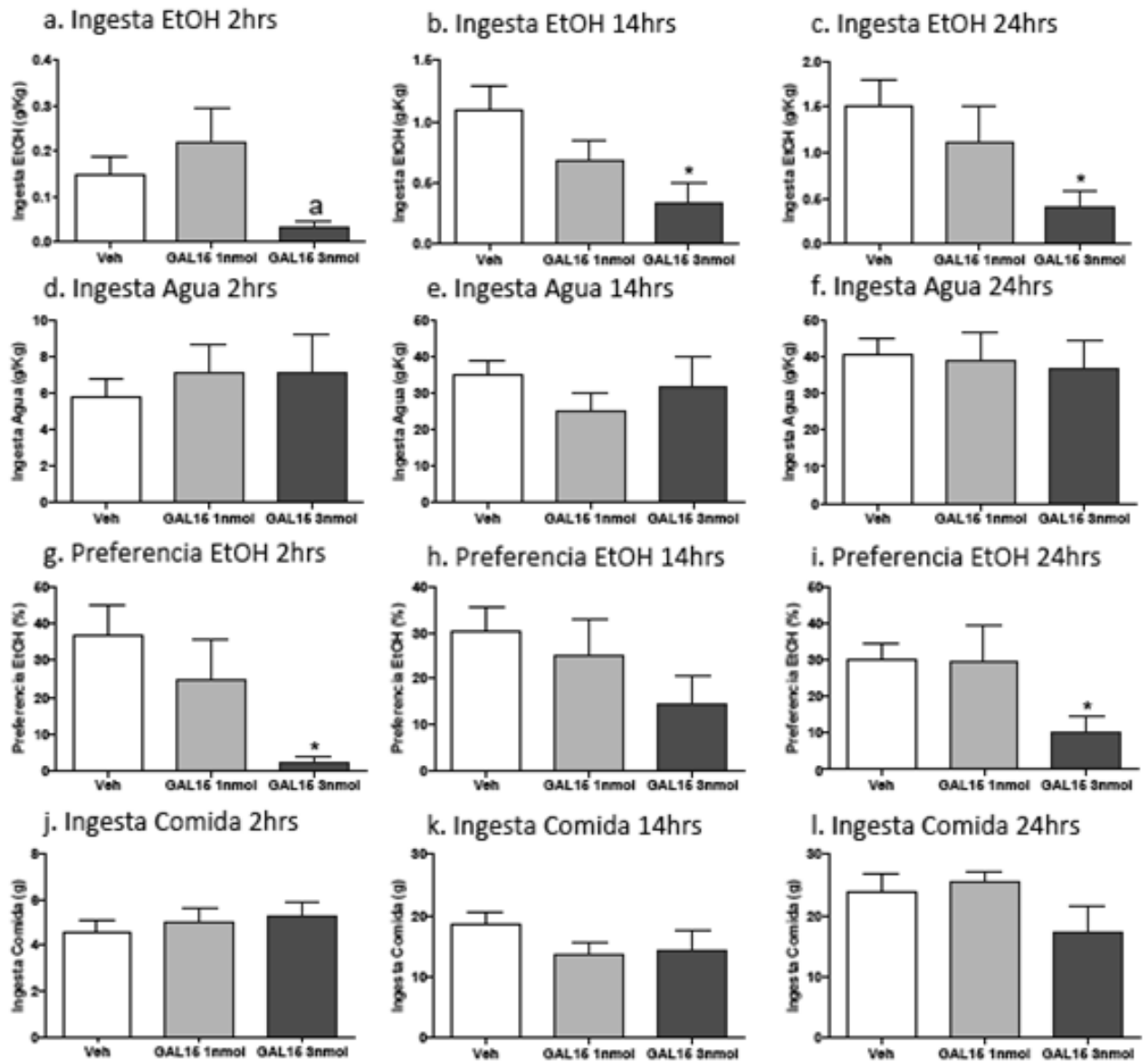


Figura 2

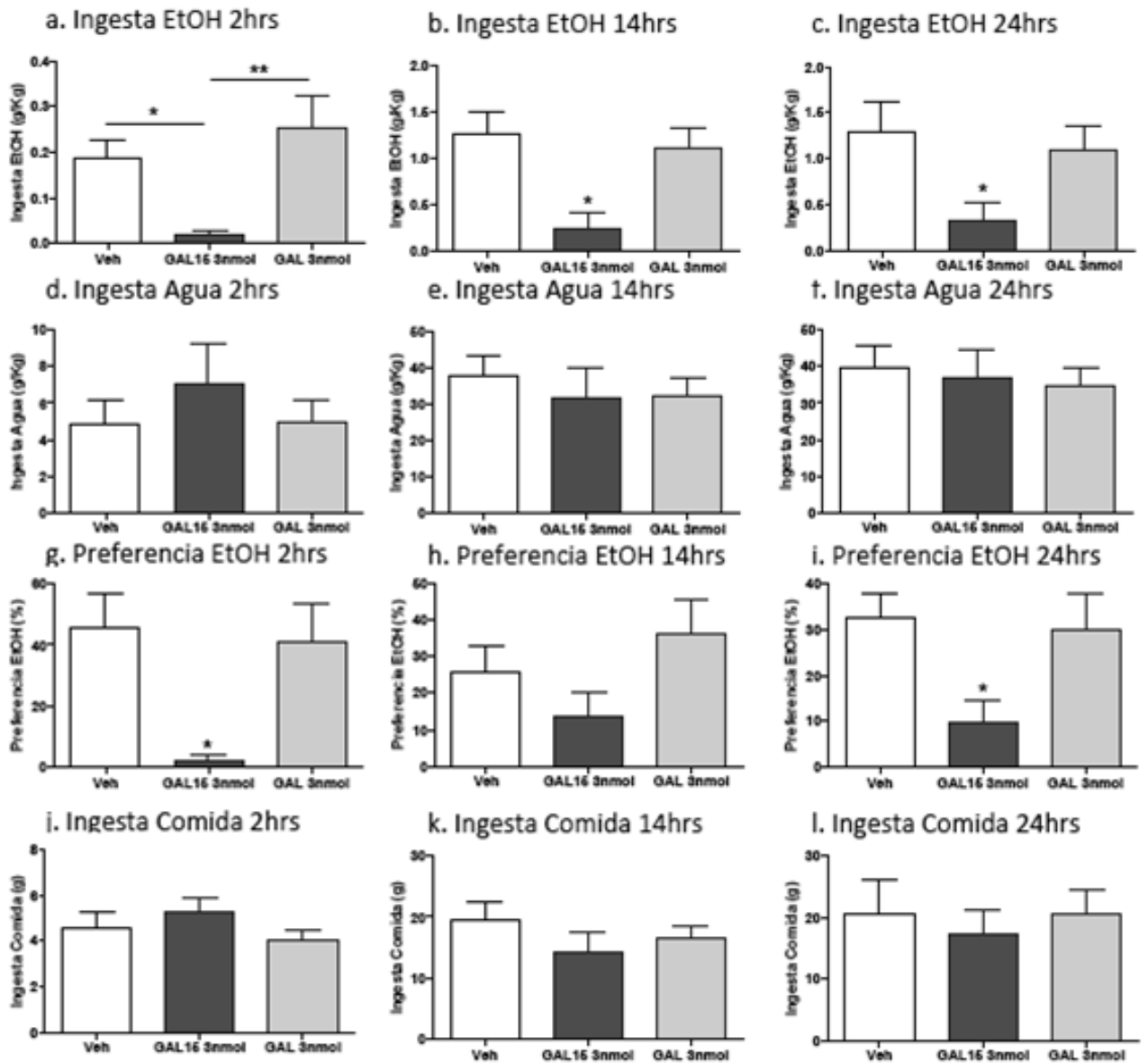


Figura 3

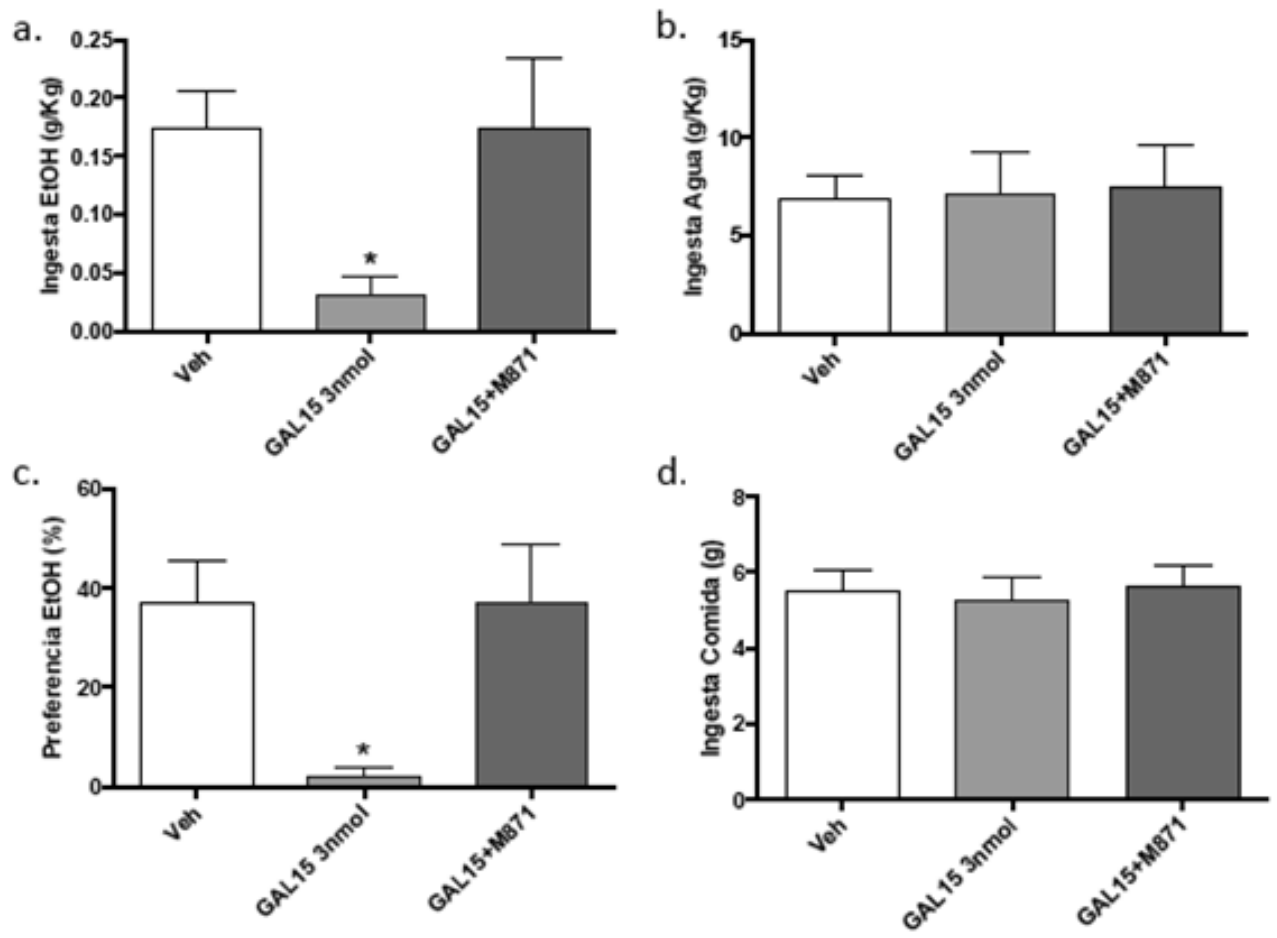


Figura 4

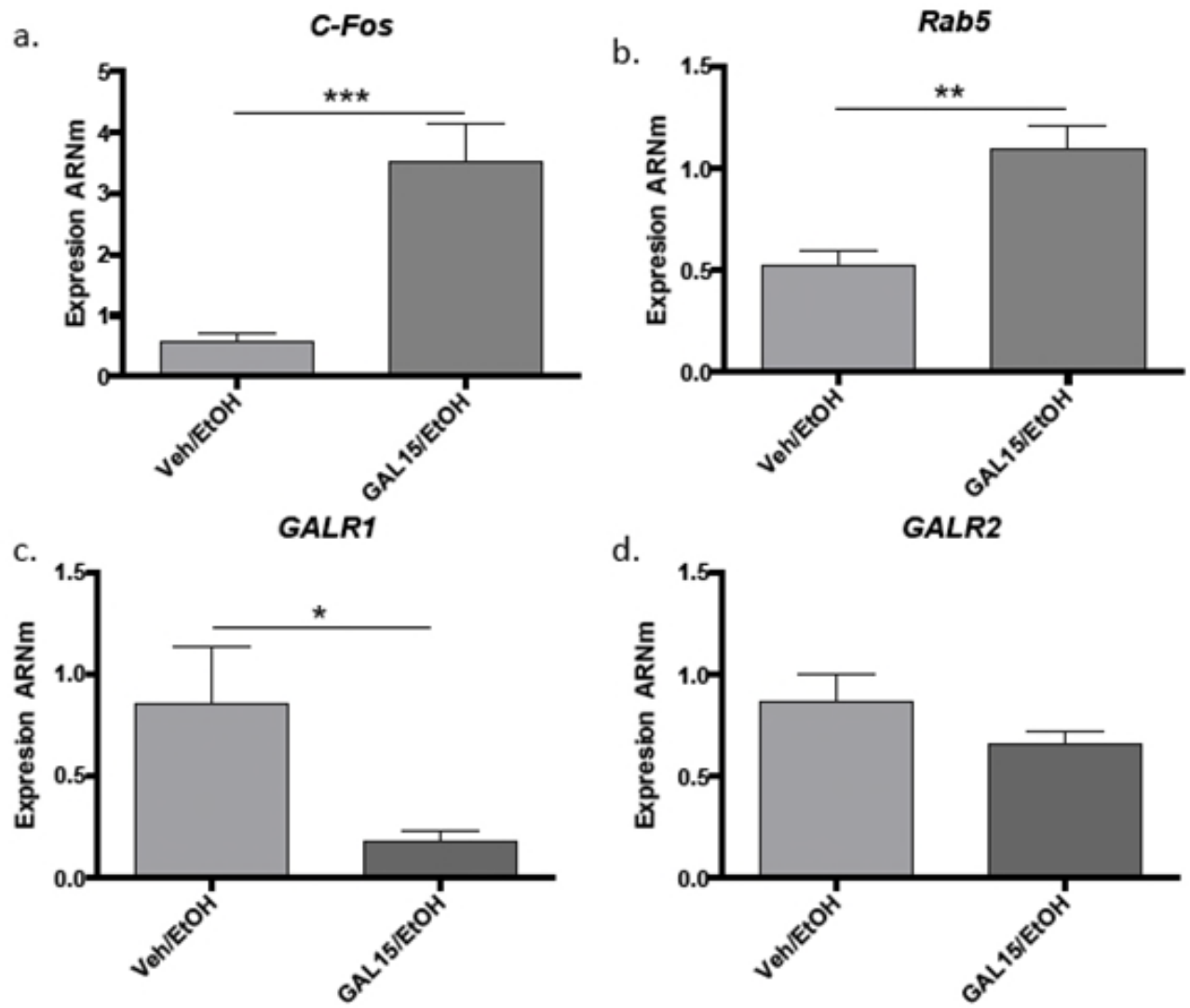
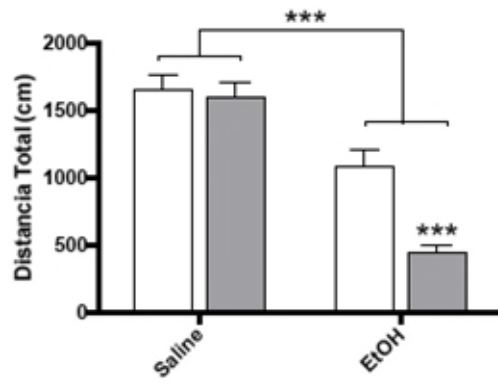


Figura 5

a.



b.

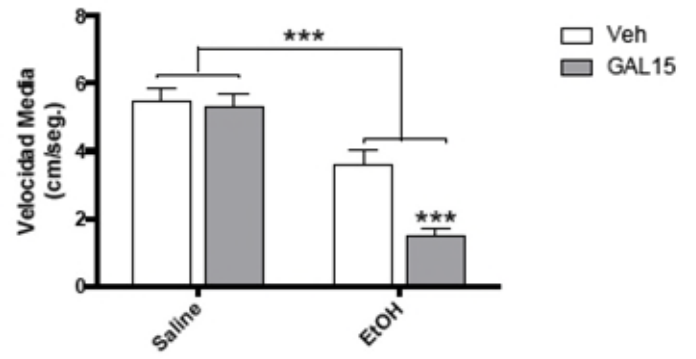


Figura 6