



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 133**

51 Int. Cl.:
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02752639 .1**
96 Fecha de presentación : **30.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1572679**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Ligandos selectivos de CRFR1.**

30 Prioridad: **01.08.2001 US 309504 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.06.2009

73 Titular/es: **THE SALK INSTITUTE FOR
BIOLOGICAL STUDIES
10010 North Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037, US**

72 Inventor/es: **Rivier, Jean, E., F.;**
Vale, Wylie, W., Jr.;
Perrin, Marilyn, H. y
Guylas, Jozsef

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 322 133 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

Ligandos selectivos de CRFR1.

5 Esta invención está dirigida, en general, a péptidos según la reivindicación principal y al tratamiento farmacéutico de mamíferos utilizando dichos péptidos. De manera más específica, la invención se refiere a análogos de péptidos según la reivindicación principal, a hentetracontapéptidos CRF que son selectivos para una familia de receptores de CRF, a composiciones farmacéuticas que contienen estos análogos de CRF, a su uso en métodos de tratamiento de mamíferos que emplean dichos análogos de CRF, y a métodos para seleccionar nuevos fármacos que utilizando dichos péptidos.

Antecedentes de la invención

15 El CRF ovino (oCRF) se caracterizó en 1981 como un péptido amidado de 41 restos. El oCRF disminuye la presión sanguínea en mamíferos cuando se inyecta de manera periférica y estimula la secreción de ACTH y β -endorfina. Después se aisló, se purificó y se caracterizó el CRF de rata (rCRF); se descubrió que era un hentetracontapéptido amidado homólogo, como se describe en la patente de EEUU nº 4.489.163. Se determinó que la secuencia de aminoácidos del CRF humano (hCRF) era la misma que la del rCRF. Cuando se administran por vía intravenosa (iv), se ha indicado que el hCRF y el oCRF provocan vasodilatación en las arterias mesentéricas para disminuir la presión sanguínea en mamíferos y también estimulan la secreción de ACTH y β -endorfina. Sin embargo, cuando se administran por vía intracerebroventricular (icv) se produce un aumento de la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea arterial media, que es un efecto secundario a la activación del sistema nervioso simpático.

25 Aunque originalmente el CRF se aisló y se caracterizó basándose en su papel en este eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), se ha descubierto que el CRF se distribuye ampliamente a través del sistema nervioso central, así como en tejidos extraneurales, tales como las glándulas adrenales, la placenta y los testículos, en donde también puede actuar como regulador paracrina o como neurotransmisor. Además, la probable implicación del CRF en trastornos afectivos, como la ansiedad, la depresión, el alcoholismo y la anorexia nerviosa, y en la modulación de la reproducción y de las respuestas inmunológicas, sugiere que los cambios en la expresión de CRF pueden tener importantes consecuencias fisiológicas y patofisiológicas. Por ejemplo, las perturbaciones en los bucles reguladores que comprenden el eje HPA a menudo producen niveles crónicamente elevados de glucocorticoides en la circulación; estos pacientes muestran los signos físicos del síndrome de Cushing, incluyendo obesidad truncal, desgaste muscular y menor fertilidad.

35 Además de su papel para mediar en la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, se ha demostrado que el CRF modula cambios autónomos y de comportamiento, algunos de los cuales se producen durante la respuesta al estrés. Muchos de estos cambios en el comportamiento han demostrado producirse independientemente de la activación del HPA, porque no son duplicados por un tratamiento con dexametasona y son insensibles a la hipofisectomía. Además, la infusión directa de CRF en el SNC imita las respuestas autónomas y de comportamiento a una diversidad de factores de estrés. Debido a que la administración periférica de CRF no afecta a algunos de estos cambios, parece que el CRF muestra una acción cerebral directa con respecto a estas funciones, que incluye la supresión del apetito, un mayor estado de alerta y capacidad de aprendizaje.

45 Como resultado de la extensa distribución anatómica y de las múltiples acciones biológicas del CRF se cree que este péptido regulador está implicado en la regulación de numerosos procesos biológicos. El CRF también se ha implicado en la regulación de respuestas inflamatorias. Aunque se ha observado que el CRF desempeña un papel proinflamatorio en ciertos modelos animales, en otros parece que el CRF suprime la inflamación reduciendo el aumento, inducido por lesiones, de la permeabilidad vascular.

50 Recientes datos clínicos han implicado al factor de liberación de corticotropina ("CRF") en trastornos neuropsiquiátricos y en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer es un trastorno cerebral neurodegenerativo que conduce a una pérdida progresiva de la memoria y a la demencia. Según estimaciones actuales, más de dos millones de individuos en EEUU sufren esta enfermedad. En particular, varias líneas de evidencias han implicado al CRF en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Behan *et al.*, *Nature*, 378(16):284, 1995). En primer lugar, se producen disminuciones dramáticas (más del 50%) en el CRF (Bissette *et al.*, *JAMA*, 254:3067, 1985; DeSouza *et al.*, *Brain Research*, 397:401, 1986; Whitehouse *et al.*, *Neurology*, 37:905, 1987; DeSouza, *Hospital Practice*, 23:59, 1988; Nemeroff *et al.*, *Regul. Peptides*, 25:123, 1989) y aumentos recíprocos en los receptores de CRF (DeSouza *et al.*, 1986; DeSouza, 1988) en las áreas cerebrocorticales afectadas en la EA, mientras que en las áreas no afectadas de la corteza no hay cambios cuantitativos en el CRF ni en los receptores de CRF (DeSouza *et al.*, 1986). En segundo lugar, estudios de reticulación de afinidad química indican que la mayor población de receptores de CRF en la corteza cerebral en EA tiene propiedades bioquímicas normales (Grigoriadis *et al.*, *Neuropharmacology*, 28:761, 1989). Además, se han observado menores concentraciones de CRF en el fluido cerebroespinal (Mouradian *et al.*, *Neural Peptides*, 8:393, 1986; May *et al.*, *Neurology*, 37:535, 1987) que se correlacionan significativamente con los índices de deterioro neuropsicológico globales, lo cual sugiere que un mayor deterioro cognitivo está asociado con una menor concentración de CRF en el fluido cerebroespinal (Pomara *et al.*, *Biological Psychiatry*, 6:500, 1989).

65 Las terapias disponibles para el tratamiento de la demencia están gravemente limitadas. El TacrineTM, un fármaco recientemente aprobado, sólo produce una mejora marginal de la memoria en pacientes con Alzheimer, y tiene unos efectos secundarios indeseables porque aumenta las enzimas hepáticas. También se han descubierto alteraciones en el

contenido de CRF cerebral en la enfermedad de Parkinson y en la parálisis supranuclear progresiva, que son trastornos neurológicos que comparten ciertas características clínicas y patológicas con la EA. En casos de enfermedad de Parkinson, el contenido de CRF disminuye y muestra un patrón de tinción similar a los casos de EA (Whitehouse *et al.*, 1987; DeSouza, 1988). En la parálisis supranuclear progresiva, el CRF disminuye hasta aproximadamente 50% de los valores control en los lóbulos frontal, temporal y occipital (Whitehouse *et al.*, 1987; DeSouza, 1988).

Algunos trastornos depresivos también están asociados con menores niveles de CRF. Los pacientes en el estado depresivo de la depresión estacional y en el periodo de fatiga del síndrome de fatiga crónica muestran menores niveles de CRF en el fluido cerebroespinal (Vanderpool *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 73:1224, 1991). Aunque algunas depresiones tienen una elevada proporción de mejoría y muchas acaban siendo autolimitantes, existen diferencias fundamentales en la velocidad a la cual se recuperan los pacientes. Un objetivo principal de la terapia es disminuir la intensidad de los síntomas y acelerar la velocidad de recuperación para este tipo de depresión, así como evitar la recaída y la recurrencia. De forma típica se administran antidepresivos pero pueden producirse efectos secundarios graves (por ejemplo, tendencias suicidas con fluoxetina, convulsiones con bupropiona) (véase Klerman *et al.* en *Clinical Evaluation of Psychotropic Drugs: Principles and Guidelines*, R.F. Prien y D.S. Robinson (eds.), Raven Press, Ltd., NY, 1994, p. 281).

La hipoactivación del sistema de estrés, según se manifiesta por unos bajos niveles de CRF, también puede desempeñar un papel en otros trastornos. Por ejemplo, algunas formas de obesidad se caracterizan por un eje hipotálamico-pituitario-adrenal hipoactivo (Kopelman *et al.*, *Clin. Endocrinol. (Oxford)*, 28:15, 1988; Bernini *et al.*, *Horm. Res.*, 31:133, 1989), algunos pacientes con síndrome de estrés postraumático tienen baja excreción de cortisol (Mason *et al.*, *J. Neu. Men. Dis.*, 174:145, 1986), y pacientes que están dejando de fumar tienen una menor excreción de adrenalina y noradrenalina, así como unos menores niveles de cortisol en la sangre (West *et al.*, *Psychopharmacology*, 84:141, 1984; Puddy *et al.*, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 11:423, 1984). Todas estas manifestaciones apuntan a un papel central del CRF en estos trastornos, porque el CRF es el regulador principal del eje hipotálamico-pituitario-adrenal. Los tratamientos para estos trastornos no son muy eficaces. Por ejemplo, el enfoque más eficaz para el tratamiento de la obesidad es un programa que cambie el comportamiento. Sin embargo, pocos pacientes alcanzan el objetivo de peso y la proporción de recaídas es elevada (véase Halmi *et al.*, en *Clinical Evaluation of Psychotropic Drugs: Principles and Guidelines*, R.F. Prien y D.S. Robinson (eds.), Raven Press, Ltd., NY, 1994, p. 547).

A la vista de las deficiencias en los tratamientos para estos trastornos y enfermedades, son necesarios tratamientos más eficaces. La presente invención aprovecha la correlación de los niveles reducidos de CRF con diversos trastornos y enfermedades con una base neurofisiológica para tratar con eficacia estas enfermedades, aumentando los niveles de CRF libre, y también proporciona otras ventajas relacionadas. Debido a que estas acciones están mediadas por CRFR2, se prefieren los análogos selectivos de CRFR2 frente a los análogos no selectivos, debido a los posibles efectos secundarios que se producen como resultado de la activación de otros receptores de CRF.

Se han desarrollado agonistas de CRF que contienen D-isómeros de α -aminoácidos, tales como los que se muestran en la patente de EEUU n° 5.109.111. Otros agonistas de CRF se describen en la patente de EEUU n° 5.278.146. Más tarde se desarrollaron agonistas de CRF cíclicos que muestran biopotencia, según se describe en las patentes de EEUU n° 5.824.771 y 5.844.074.

CRF-R se refiere a una familia de subtipos de proteínas receptoras que participan en la respuesta acoplada a proteína G de las células al CRF. Los CRF-R son acoplados por proteínas G heterotriméricas a diversas enzimas intracelulares, canales iónicos y transportadores. Las proteínas G se asocian con las proteínas receptoras en la cara intracelular de la membrana plasmática. Un agonista que se une a un CRF-R cataliza el intercambio de GTP por GDP en la subunidad α ("activación" de la proteína G), dando como resultado su disociación y la estimulación de uno (o más) de los diversos canales y enzimas transductoras de señales. La proteína G estimula preferentemente a efectores concretos y, por tanto, puede determinarse la especificidad de la transducción de señales mediante la especificidad de la interacción de proteína G/receptor. Las proteínas CRF-R median en la transducción de señales a través de la modulación de la adenilato ciclasa y, quizás, a través del recambio de PI. Por ejemplo, cuando el CRF se une y activa el CRF-R, la adenilato ciclasa provoca un aumento del nivel de AMPc intracelular. Un bioensayo eficaz para evaluar si un compuesto de ensayo es capaz de aumentar el AMPc intracelular se realiza cultivando células que contienen ADNc que expresa las proteínas receptoras de CRF en presencia de un agonista o antagonista potencial cuya capacidad para modular la actividad transductora de señales de las proteínas receptoras de CRF se quiere determinar. Estas células transformadas se controlan para determinar el aumento o la disminución del nivel de AMPc intracelular, lo cual proporciona una determinación de la eficacia del agonista o antagonista potencial. Los métodos para medir los niveles intracelulares de AMPc o para medir la actividad ciclasa son muy conocidos en la técnica.

Las acciones fisiológicas de CRF son mediadas a través de la activación de al menos dos receptores de alta afinidad, CRFR1 y CRFR2, que son miembros de la familia de receptores 7-transmembrana (Chen R., *et al.*, *P.N.A.S.*, 90:8967-8971 (1993); Perrin, M., *et al.*, *P.N.A.S.*, 92:2969-2973 (1995); Lovenberg, T., *et al.*, *P.N.A.S.*, 92:836-840 (1995); K.D. Dieterich, *et al.*, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* (1997), 105:65-82; y J. Spiess, *et al.*, *Trends Endocrinol. Metab.* (1998), 9:140-145). Pruebas procedentes de animales transgénicos con inactivación de genes (A. Contarino *et al.*, *Brain Res.* (1999), 835:1-9; G.W. Smith *et al.*, *Neuron* (1988), 20:1093-1102; y P. Timpl *et al.*, *Nature Genet.* (1998), 19:162-166), estudios con oligonucleótidos antisentido (S.C. Heinrichs *et al.*, *Regul. Pept.* (1997), 71:15-21; G. Liebsch *et al.*, *J. Psychiatric Res.* (1999), 33:153-163; y T. Skutella *et al.*, *Neuroscience* (1998), 85:795-805) y antagonistas de CRFR1 (K.E. Habib *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), 97:6079-6084; J. Lundkvist *et al.*, *Eur.*

J. Pharmacol (1996), 309:195-200; R.S. Mansbach *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* (1997), 323:21-26; y S.C. Weninger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96:8283-8288) proporcionan pruebas de la implicación del CRFR1 en la mediación de los efectos ansiogénicos del CRF.

5 En fechas más recientes se ha identificado el CRF2 (T. Kishimoto *et al.*, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* (1995), 92:1108-1112; W.A. Kostich *et al.*, *Mol. Endocrinol.* (1998), 12:1077-1085; T.W. Lovenberg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995), 92:836-840; y M. Perrin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995), 92:2969-2973) y existen al menos tres variants de corte y empalme. Los subtipos CRFR1 y CRFR2 son 70% homólogos en sus secuencias de aminoácidos pero parecen ser diferentes desde el punto de vista farmacológico (D.P. Behan *et al.*, *Mol. Psychiatry* (1996), 1:265-277; y K.D. Dieterich *et al.*, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* (1997), 105:65-82) y anatómico (D.T. Chalmers *et al.*, *J. Neurosci.* (1995), 15:6340-6350; y D.H. Rominger *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1998), 286:459-468).

15 El CRFR1 se distribuye por todo el cerebro y los sitios de transmisión sensorial y motora, mientras que el CRFR2 se expresa en regiones del cuerpo en que no hay expresión o hay poca expresión de CRFR1, tales como sitios periféricos, por ejemplo los vasos sanguíneos, el corazón, el tracto GI, los pulmones y la piel. Además, aunque la expresión de CRFR1 es muy alta en las estructuras de transmisión neocorticales, cerebelares y sensoriales, la expresión de CRFR2 en general está limitada a las estructuras subcorticales. Dentro de la glándula pituitaria puede detectarse ARNm de CRFR2 a bajos niveles en células dispersas, mientras que el ARNm del receptor CRF1 puede detectarse con facilidad en los lóbulos anterior e intermedio.

20 Esta distribución heterogénea del ARNm de CRFR1 y de CRFR2 sugiere unos papeles funcionales diferenciados para cada receptor en los sistemas relacionados con el CRF. El CRFR1 puede considerarse como el principal receptor de CRF pituitario neuroendocrino y es importante en los papeles corticales, cerebelares y sensoriales del CRF.

25 Ambos CRFR1 y CRFR2 se encuentran en la pituitaria y a través del neocórtex (en especial en las cortezas prefrontal, cingulada, estriada e insular), la amígdala, y la formación hipocámpica en primates. En primates, ambos CRFR1 y CRFR2 pueden estar implicados en la mediación de los efectos del CRF sobre la cognición, el comportamiento y la función pituitaria-adrenal. La presencia de CRFR1 (pero no de CRFR2) dentro del locus cerúleo, la corteza cerebelar, el núcleo del tracto solitario, el tálamo y el cuerpo estriado, y de CRFR2 (pero no de CRFR1) en el plexo coroide, ciertos núcleos hipotalámicos, el *nucleus prepositus* y el núcleo de los terminales estriados sugiere que cada subtipo de receptor también puede tener papeles funcionales diferenciados dentro del sistema nervioso central de primates. Véase, por ejemplo, Sánchez *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, 408:365-377.

35 El CRF se ha visto implicado ampliamente en un papel principal para modular las respuestas endocrinas, autónomas, de comportamiento e inmunológicas al estrés. La reciente clonación de múltiples receptores para CRF, así como el descubrimiento de antagonistas de receptores no peptídicos para los receptores de CRF, ha hecho que comience una nueva era en el estudio del CRF. En la actualidad, existen cinco dianas diferenciadas para el CRF con secuencias de ADNc, farmacología y localización exclusivas. Éstas se dividen en tres clases diferenciadas, codificadas por tres genes diferentes y se han denominado CRFR1 y CRFR2 (que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G) y proteína de unión a CRF.

40 La expresión de estos receptores en líneas celulares de mamífero ha permitido la identificación de antagonistas de receptores no peptídicos selectivos y de alta afinidad. Mientras que los ligandos naturales de mamífero oCRF y r/hCRF tienen una alta afinidad por el subtipo CRFR1, tienen menor afinidad por la familia del CRFR2, lo que les hace ser marcadores ineficaces para el CRF2. Se ha caracterizado la [¹²⁵I]sauvagina como un ligando de alta afinidad para los subtipos CRFR1 y CRFR2, y se ha utilizado en estudios de unión de radioligandos y autorradiográficos de receptores, como una herramienta para ayudar al descubrimiento de antagonistas de receptores selectivos de molécula pequeña. En fechas recientes se ha identificado una serie de antagonistas de CRFR1 no peptídicos que pueden bloquear selectiva y específicamente el subtipo CRFR1. Compuestos como CP 154.526, NBI 27914 y antalarmina inhiben la estimulación por CRF del AMPc o la liberación de ACTH estimulada por CRF desde células de la pituitaria anterior de rata cultivadas. Además, cuando se administran de forma periférica, estos compuestos compiten por la unión *ex vivo* de [¹²⁵I]sauvagina a CRFR1 en secciones cerebrales, demostrando su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. En estudios *in vivo*, la administración periférica de estos compuestos atenúa el aumento, inducido por el estrés, de los niveles plasmáticos de ACTH en ratas, demostrando que el CRFR1 puede ser bloqueado en la periferia. Además, los antagonistas de CRFR1 administrado de forma periférica también han demostrado inhibir la actividad de ataques inducidos por CRF. Estos datos demuestran claramente que los antagonistas de CRFR1 no peptídicos, cuando se administran de manera sistémica, pueden bloquear de forma específica los CRFR1 centrales y proporcionan herramientas que pueden utilizarse para determinar el papel de CRFR1 en diversos trastornos neuropsiquiátricos y neurodegenerativos. Además, estas moléculas serán útiles para el descubrimiento y el desarrollo de compuestos terapéuticos potenciales oralmente activos para estos trastornos (McCarthy *et al.*, *Curr. Pharm. Des.* (1999), 5(5): 289-315).

65 Debido a que el CRFR1 controla unas funciones que son diferentes a las del CRFR2, resultaría valioso poder regular una familia de receptores sin afectar significativamente a la otra familia. El oCRF y el rCRF se unen de manera sustancialmente similar a ambas familias CRFR1 y CRFR2. A. Ruhmann *et al.*, *P.N.A.S.*, 95, 15264-15269 (diciembre de 1998) indicaron que [D-Phe¹¹, His¹²]sauvagina(11-40) es un antagonista que actúa de manera selectiva con respecto a CRFR2 y muestra un antagonismo competitivo igual a aproximadamente 30% del que presenta el entonces mejor antagonista para el CRFR1, y un antagonismo casi igual para el CRFR2 comparado con este anterior mejor compuesto

indicado. A partir de entonces se ha continuado la búsqueda de análogos de CRF que sean bioactivos como agonistas selectivos de CRFR1, y también de análogos que actúen como antagonistas competitivos eficaces para modular la activación de CRFR1 y que tengan menos efecto sobre CRFR2.

5 Sumario de la invención

Ahora se ha descubierto una clase de péptidos de CRF que son ligandos del CRFR1, que son análogos de hCRF/ oCRF y preferiblemente tienen un enlace ciclante entre los restos que se corresponden con los restos 31 y 34 de la molécula de CRF nativa, siendo dicho enlace ciclante preferiblemente un enlace amida entre las cadenas laterales de los restos aminoácidos en estas posiciones. El C-terminal de las moléculas es la amida nativa; sin embargo, el N-terminal está preferiblemente acortado por la eliminación de los primeros 3 restos y por la acilación del resto en la posición 4 del N-terminal. Los péptidos lineales comparables también muestran selectividad y alta potencia de unión al CRFR1; sin embargo, se cree que no son tan biopotentes. Utilizando técnicas muy conocidas en la técnica, los agonistas selectivos pueden transformarse en antagonistas de CRF que bloqueen, de forma selectiva, el CRFR1 manteniendo la porción cíclica descrita de la estructura del núcleo.

Las composiciones farmacéuticas según la invención incluyen estos ligandos de CRFR1 o sus sales de adición no tóxicas que están dispersos en un vehículo líquido o sólido farmacéuticamente aceptable. Esta formulación es fácil de preparar por su alta solubilidad a pH fisiológico. La administración de estos péptidos o sus sales de adición farmacéuticamente aceptables a mamíferos, en particular a seres humanos, según la invención puede realizarse para la regulación de la secreción de ACTH, β -endorfina, β -lipotropina, corticosterona y otros productos del gen de proopiomelanocortina (POMC) y/o para afectar a las funciones del estado de ánimo, del comportamiento y gastrointestinales y las actividades del sistema nervioso autónomo. Por ejemplo, estos análogos de CRF pueden administrarse para que aumenten los niveles de ACTH para tratar el choque y afecciones relacionadas. De manera muy general, puede utilizarse la administración de un compuesto de la presente invención para tratar una amplia variedad de trastornos o enfermedades, en particular asociadas con el CRFR1. En particular, los compuestos de la presente invención pueden administrarse a un animal para el tratamiento de la depresión, el trastorno de ansiedad, el trastorno de pánico, el trastorno obsesivo-compulsivo, la hipertensión reactiva, la anorexia nerviosa, la bulimia, el síndrome del intestino irritable, la supresión inmunológica inducida por el estrés y la epilepsia.

Los péptidos también proporcionan la base para valiosos métodos para la selección de fármacos para descubrir moléculas aún más potentes que se unan y/o activen los receptores de CRF debido a su alta afinidad por receptores de CRF, y pueden utilizarse análogos radiactivos como marcadores que se unen de manera selectiva al CRFR1 y son valiosos para fines de selección de alto rendimiento.

En un aspecto particular, la invención proporciona un péptido ligando de CRFR1 de 38 restos que se une a CRFR1 con una afinidad sustancialmente mayor que con la que se une a CRFR2, teniendo dicho péptido la siguiente fórmula, o su sal no tóxica:

Y_1 -Pro-Pro-R₆-Ser-R₈-Asp-R₁₀-R₁₁-D-Phe-R₁₃-R₁₄-R₁₅-Arg-R₁₇-R₁₈-R₁₉-R₂₀-R₂₁-R₂₂-R₂₃-R₂₄-R₂₅-R₂₆-R₂₇-R₂₈-R₂₉-Gln-Glu-R₃₂-R₃₃-R₃₄-Arg-R₃₆-R₃₇-R₃₈-R₃₉-R₄₀-R₄₁-NH₂

en la que Y₁ es un grupo acilo que no tiene más de 15 átomos de carbono o es tirosina radioyodada; R₆ es Ile, Met o Nle; R₈ es Leu o Ile; R₁₀ es Leu o CML; R₁₁ es Thr o Ser; R₁₃ es His, Tyr o Glu; R₁₄ es CML o Leu; R₁₅ es CML o Leu; R₁₇ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₈ es Val, CML, Nle o Met; R₁₉ es CML, Leu o Ile; R₂₀ es Glu, D-Glu o His; R₂₁ es Nle, Leu, CML o Met; R₂₂ es Ala, D-Ala, Aib, Thr, Asp o Glu; R₂₃ es Arg o Lys; R₂₄ es Ala, Gln, Ile, Asn, CML o Aib; R₂₅ es Asp o Glu; R₂₆ es Gln, Asn o Lys; R₂₇ es CML, Glu, Gln o Leu; R₂₈ es Ala, Lys, Arg o Aib; R₂₉ es Gln, Aib o Glu; R₃₂ es Aib o un L- o D-isómero de un α -aminoácido natural diferente de Cys; R₃₃ es Aib o un L- o D-isómero de Ser, Asn, Leu, Ala, CML o Ile; R₃₄ es Lys u Orn; R₃₆ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₃₇ es CML, Leu, Nle o Tyr; R₃₈ es Nle, Met, CML o Leu; R₃₉ es Glu, Aib o Asp; R₄₀ es Ile, Aib, CML, Thr, Glu, Ala, Val, Leu, Nle, Phe, Nva, Gly o Gln; y R₄₁ es Ala, Aib, Ile, CML, Gly, Val, Leu, Nle, Phe, Nva o Gln; con la condición de que puede existir un enlace ciclante entre Glu en la posición 31 y R₃₄, y con la condición además de que D-2Nal o D-Leu pueden reemplazar a D-Phe.

En otro aspecto particular, la invención proporciona un péptido ligando de CRFR1 de 38 restos que se une a CRFR1 con una afinidad sustancialmente mayor que con la que se une a CRFR2, teniendo dicho péptido la fórmula Y₁-Pro-Pro-A-D-Xaa-B-Glu-Xaa_a-Xaa_b-Xaa_c-C-NH₂, en la que Y₁ es un grupo acilo que no tiene más de 15 átomos de carbono o es tirosina radioyodada; A es una secuencia de 6 restos aminoácidos que se encuentra entre Pro en la posición 5 y Phe en la posición 12 de r/hCRF o la correspondiente secuencia de otro péptido de la familia del CRF; D-Xaa es D-Phe, D-2Nal o D-Leu; B es una secuencia de 18 restos aminoácidos que se encuentra entre Phe en la posición 12 y Ala en la posición 31 de r/hCRF o la correspondiente secuencia de otro péptido de la familia del CRF; Xaa_a es cualquier L- o D- α -aminoácido natural diferente de Cys o es Aib; Xaa_b es Aib o un L- o D-isómero de Ser, Asn, Leu, Ala, CML o Ile; Xaa_c es Lys u Orn, cuya cadena lateral puede estar unida en un enlace ciclante amida con la del Glu; y C es una secuencia de los últimos 7 restos aminoácidos de la porción C-terminal de cualquier péptido de la familia del CRF; con la condición de que Nle o Leu pueden estar reemplazados por Met en A, B y/o C.

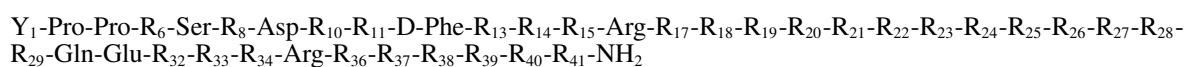
Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Debido a que los ligandos del receptor de CRF de la presente invención muestra actividad en el sitio del receptor CRFR1 pueden utilizarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos o enfermedades, incluyendo trastornos o enfermedades endocrinas, psiquiátricas y neurológicas. De forma más específica, los ligandos del receptor de CRF de la presente invención pueden ser útiles para tratar afecciones o trastornos fisiológicos que surgen de la hipersecreción de CRF. Debido a que se cree que el CRF es un neurotransmisor fundamental que activa y coordina las respuestas endocrinas, de comportamiento y automáticas al estrés, los ligandos del receptor de CRF de la presente invención pueden utilizarse para tratar trastornos neuropsiquiátricos. Los trastornos neuropsiquiátricos que pueden ser tratados con los ligandos del receptor de CRF de esta invención incluyen trastornos afectivos, tales como depresión; trastornos relacionados con la ansiedad, tales como trastorno de ansiedad generalizado, trastorno de pánico, trastorno obsesivo-compulsivo, agresión anormal, anomalías cardiovasculares, tales como angina inestable e hipertensión reactiva; y trastornos alimentarios, tales como anorexia nerviosa, bulimia y síndrome del intestino irritable. Los ligandos del receptor de CRF también pueden ser útiles para tratar la inmunosupresión inducida por el estrés asociada con diversos estados de enfermedad, así como los accidentes cerebrovasculares. Otros usos de los ligandos del receptor de CRF de esta invención incluyen el tratamiento de trastornos inflamatorios (tales como artritis reumatoide, uveitis, asma, enfermedad del intestino inflamatoria y motilidad GI), enfermedad de Cushing, espasmos infantiles, epilepsia y otros ataques en niños y adultos, y diversos abusos de sustancias y síndromes de abstinencia (incluyendo el alcoholismo).

En otra realización de la invención se describen composiciones farmacéuticas que contiene uno o más ligandos del receptor de CRF. Con el objetivo de su administración, los compuestos de la presente invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas comprenden un ligando del receptor de CRF de la presente invención y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. El ligando del receptor de CRF debe estar presente en la composición en una cantidad que sea eficaz para tratar un trastorno concreto, es decir, en una cantidad suficiente para lograr la actividad CRF deseada, y preferiblemente con una toxicidad aceptable para el paciente. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir un ligando del receptor de CRF en una cantidad de 0,1 mg a 250 mg por dosificación dependiendo de la vía de administración, y más preferiblemente de 1 mg a 60 mg. Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad las concentraciones y las dosificaciones apropiadas.

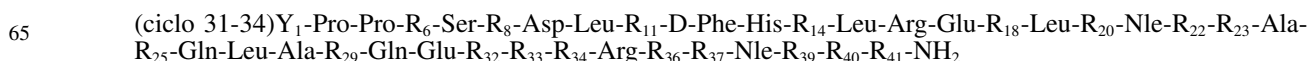
La nomenclatura utilizada para definir los péptidos es la especificada por Schoreder y Lubke, "The Peptides", Academic Press (1965), en donde, según la representación convencional, el grupo amino aparece a la izquierda y el grupo carboxilo a la derecha. Se emplean las abreviaturas de 3 letras convencionales para identificar los restos α -aminoácidos, y cuando el resto aminoácido tenga formas isómeras es la forma L del aminoácido la representada, a menos que se indique lo contrario, por ejemplo Ser = L-serina, Orn = L-ornitina, Nle = L-norleucina, Nva = L-norvalina, Agl = aminoglicina, Abu = ácido L-2-aminobutírico, Dbu = ácido L-2,4-diaminobutírico, Dpr = ácido L-2,3-diaminopropiónico, Hly = L-homolisina, y Har = L-homoarginina. Además se utilizan las siguientes abreviaturas: CML = C ^{α} CH₃-L-leucina, Aib = C ^{α} CH₃-L-alanina o ácido 2-aminoisobutírico, Nal = L- β -(1- o 2-naftil)alanina, Pal = L- β -(2-, 3- o 4-piridil)alanina, Cpa = L-(2-, 3- o 4-cloro)fenilalanina, Aph = L-(2-, 3- o 4-amino)fenilalanina, Amp = (2-, 3- o 4-aminometil)fenilalanina, y Nic = 3-carboxipiridina (o ácido nicotínico).

En general, los ligandos de CRFR1 incluyen un D-isómero en la posición 12, preferiblemente incluyen un enlace ciclante entre los restos en la posición 31 y la posición 34, y tienen la siguiente secuencia de aminoácidos, o sus sales no tóxicas equivalentes:



en la que Y₁ es un grupo acilo que no tiene más de 15 átomos de carbono o es tirosina radioyodada; R₆ es Ile, Met o Nle; R₈ es Leu o Ile; R₁₀ es Leu o CML; R₁₁ es Thr o Ser; R₁₃ es His, Tyr o Glu; R₁₄ es CML o Leu; R₁₅ es CML o Leu; R₁₇ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₈ es Val, CML, Nle o Met; R₁₉ es CML, Leu o Ile; R₂₀ es Glu, D-Glu o His; R₂₁ es Nle, Leu, CML o Met; R₂₂ es Ala, D-Ala, Aib, Thr, Asp o Glu; R₂₃ es Arg o Lys; R₂₄ es Ala, Gln, Ile, Asn, CML o Aib; R₂₅ es Asp o Glu; R₂₆ es Gln, Asn o Lys; R₂₇ es CML, Glu, Gln o Leu; R₂₈ es Ala, Lys, Arg o Aib; R₂₉ es Gln, Aib o Glu; R₃₂ es Aib o un L- o D-isómero de un α -aminoácido natural diferente de Cys; R₃₃ es Aib o un L- o D-isómero de Ser, Asn, Leu, Ala, CML o Ile; R₃₄ es Lys u Orn; R₃₆ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₃₇ es CML, Leu, Nle o Tyr; R₃₈ es Nle, Met, CML o Leu; R₃₉ es Glu, Aib o Asp; R₄₀ es Ile, Aib, CML, Thr, Glu, Ala, Val, Leu, Nle, Phe, Nva, Gly o Gln; y R₄₁ es Ala, Aib, Ile, CML, Gly, Val, Leu, Nle, Phe, Nva o Gln; con la condición de que puede existir un enlace ciclante entre Glu en la posición 31 y R₃₄, y con la condición además de que D-2Nal o D-Leu pueden reemplazar a D-Phe.

Un grupo particularmente preferido de agonistas de CRF tiene la secuencia de aminoácidos (incluyendo sus sales no tóxicas):



ES 2 322 133 T3

en la que Y₁ es un grupo acilo que no tiene más de 7 átomos de carbono; R₂₀ es Glu o D-Glu; R₂₂ es Ala o Thr; R₂₉ es Gln o Glu; R₃₂ es His, Aib, Ala, Gly, Leu, Gln o Glu; R₃₆ es Lys o Leu; R₃₇ es Leu o CML; R₃₉ es Glu o Asp; R₄₀ es Ile, CML o Glu; y R₄₁ es Ile, Aib o Ala; siendo el resto de las variables como se definió anteriormente.

5 Los análogos específicos que se consideran que son particularmente biopotentes desde el punto de vista de aumentar los niveles de ACTH son:

(ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41);

10 (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-oCRF(4-41);

(ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Aib³³, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41);

(ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML²⁷, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41);

15 (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41); y

(ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, Aib³³, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41).

20 Los péptidos se sintetizan mediante un método adecuado, tal como mediante técnicas exclusivamente en fase sólida, mediante técnicas en fase sólida parcial, mediante condensación de fragmentos o mediante la adición en disolución clásica.

25 Una práctica habitual en las síntesis químicas de péptidos es la protección de los grupos de cadena lateral lábiles de los diversos restos aminoácidos con grupos protectores adecuados que evitarán que se produzca una reacción química en ese sitio hasta que el grupo finalmente se retire. Normalmente también es habitual la protección del grupo α -amino de un aminoácido o un fragmento mientras que esa entidad reacciona en el grupo carboxilo, seguido de la retirada selectiva del grupo protector de α -aminoácido para permitir que pueda producirse después la reacción en ese emplazamiento. Por consiguiente, es habitual que, como etapa de la síntesis, se produzca un compuesto intermedio que incluya cada uno de los restos aminoácidos colocados en su secuencia deseada en la cadena peptídica teniendo diversos de estos restos grupos protectores de la cadena lateral.

30 Los péptidos se preparan preferiblemente utilizando la síntesis en fase sólida, como la descrita por Burgess, K., Solid-Phase Organic Synthesis (John Wiley & Sons, 2000) y/o Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, p. 2149 (1964). Por tanto los análogos de CRF pueden prepararse de una manera sencilla y después simplemente ensayarse para detectar actividad biológica, lo cual favorece la preparación y la evaluación rápidas de ligandos de CRFR1. La síntesis en fase sólida comienza desde el extremo C-terminal del péptido mediante el acoplamiento de un α -aminoácido protegido a una resina adecuada como se indica, en general, en la patente de EEUU n° 4.244.946, otorgada el 21 de junio, 1981, de Rivier *et al.* El material de partida para un ligando de CRFR1 puede prepararse, por ejemplo, uniendo una Ile protegida en su α -amino a una resina de MBHA.

35 Después de completar la secuencia de aminoácidos deseada, el péptido intermedio se retira del soporte de resina a menos que se desee formar el enlace ciclante mientras permanece unido a la resina, como se describe a continuación. La retirada se realiza mediante un tratamiento con un reactivo, tal como fluoruro de hidrógeno (HF) líquido, que no sólo escinde el péptido de la resina sino que también escinde el resto de los grupos protectores de cadena lateral y el grupo protector de α -amino, si aún está presente, para obtener el péptido. Cuando se emplea fluoruro de hidrógeno para la retirada se incluye anisol o cresol y sulfuro de metiletilo en el recipiente de reacción como captadores. Cuando Met está presente en la secuencia, el grupo protector BOC puede retirarse con ácido trifluoroacético (TFA)/etanditiol antes de escindir el péptido de la resina para eliminar la S-alkilación.

40 La etapa de ciclación para el análogo del péptido de CRF depende, por supuesto, del tipo de enlace que se desea entre los restos en las posiciones 31 y 34. Para realizar un enlace ciclante amida (puente de lactama), la ciclación puede llevarse a cabo mientras el péptido parcialmente protegido permanece unido a la resina, como se describe en las patentes de EEUU n° 5.064.939 y 5.043.322. Este procedimiento crea, de manera eficaz, un enlace ciclante amida entre las dos cadenas laterales deseadas mientras que otros restos, como Asp, Glu y/o Lys, en el intermedio peptídico mantienen la protección de su cadena lateral.

45 Cuando se cicla mediante un enlace amida entre un grupo carboxilo de la cadena lateral del resto en la posición 31 y un grupo amino de la cadena lateral del resto en la posición 34, o viceversa (lo cual se considera un enlace equivalente), es preferible sintetizar el péptido protegido sobre una resina de MBHA o BHA y derivatizar el éster bencílico de carboxilo ácido de la cadena lateral a la hidracida mientras el péptido se mantiene unido a la resina, y después hacerlo reaccionar con una cadena lateral con amino selectivamente desprotegido, como se indica en la patente de EEUU n° 5.043.322. Preferiblemente, la ciclación se lleva a cabo utilizando un grupo protector lábil frente a bases, por ejemplo OFm, para el carboxilo de la cadena lateral del resto implicado en el puente del enlace amida, y utilizando Fmoc como grupo protector para el amino de la cadena lateral del otro resto implicado. El grupo protector de α -amino en el resto N-terminal, tanto si se va a acilar como si no, y el resto de los grupos protectores de cadena lateral permanecen en su sitio mientras se retiran los dos grupos lábiles frente a bases utilizando piperidina o similar. Después de esta retirada selectiva se realiza la reacción para conseguir la ciclación mediante un tratamiento con

BOC que produce la generación sustancialmente completa del enlace amida. Después de la ciclación, el péptido está completamente desprotegido y se escinde de la resina utilizando un reactivo, como HF. Opcionalmente, primero puede retirarse un grupo protector BOC del N-terminal utilizando TFA.

5 Como alternativa, las ciclaciones de los péptidos, tal como mediante enlaces amida, también puede realizarse siguiendo las indicaciones de las patentes de EEUU n° 4.115.554 (19 de septiembre, 1978), 4.133.805 (9 de enero, 1979), 4.140.767 (20 de febrero, 1979), 4.161.521 (17 de julio, 1979), 4.191.754 (4 de marzo, 1980), 4.238.481 (9 de diciembre, 1980), 4.244.947 (13 de enero, 1981), y 4.261.885 (14 de abril, 1981).

10 En los ejemplos que aparecen a continuación se indican ciertos métodos preferidos para sintetizar estos péptidos; sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán con facilidad técnicas para sintetizar los péptidos de la invención, por ejemplo, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Oxford University Press, 2000); Marshak y Liu, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Delivery, and Targeting (Current Communications in Molecular Biology) (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Cabilly, S., Combinatorial Peptide Library Protocols, 1ª edición
15 (Humana Press, 1998); Crabb, J.W., Techniques in Protein Chemistry V (Academic Press, 1994); Lloyd-Williams *et al.*, Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (New Directions in Organic and Biological Chemistry) (CRC Press, 1997).

Puede realizarse un ensayo sencillo utilizando células de la pituitaria anterior de rata en cultivo en monocapa para
20 determinar qué tipo de actividad CRF mostrará un péptido candidato; el procedimiento que se utiliza es el indicado de modo general en *Endocrinology*, 91, 562 (1972). El ensayo demostrará si un péptido candidato muestra algo de actividad como agonista de CRF y estimula la secreción de ACTH mediante la activación de los receptores de CRF sobre estas células; de esta manera se mide su actividad CRF intrínseca mediante el uso de dosis elevadas. Un ligando de CRFR1 candidato también puede evaluarse con facilidad en un ensayo de unión empleando receptores de CRF
25 conocidos, tales como los descritos en Perrin, M., *et al.*, *Endocrinology*, 118, 1171-1179 (1986). Los receptores de CRF y los detalles de los ensayos de unión se analizan más adelante en esta memoria descriptiva. De modo muy general, un ensayo de unión puede llevarse a cabo con CRFR1 humano utilizando un radioligando como (ciclo 30-33)[I¹²⁵-D-Tyr¹², Glu³⁰, Lys³³, Nle^{21,38}]-r/hCRF(12-41), o su análogo que tiene D-His³², que tiene una alta afinidad por el CRFR1 humano. Por ejemplo, el compuesto nombrado en primer lugar tiene una K_D de 2,0 nanomolar (1,4-2,9) para
30 la unión a hCRFR1, que es fundamentalmente igual a la del análogo de D-Phe¹² comparable. Uno de estos ensayos de unión representativos que utiliza el receptor CRFR1 se describe en Chen, *et al.*, *P.N.A.S.*, 90, 8967-8971 (octubre, 1993). Estos ensayos se emplean, de forma ventajosa, para seleccionar ligandos de tipo CRF potenciales, en forma peptídica u otra forma, utilizando un análogo de CRF cíclico marcado, y preferiblemente un agonista o antagonista de CRF cíclico marcado con alta afinidad.

35 Ahora se han clonado los receptores de CRF y se describen en el artículo mencionado anteriormente de Chen *et al.*, en Perrin, M., *et al.*, *P.N.A.S.*, 92, 2969-2973 (marzo, 1995), y en Lovenberg, T., *et al.*, *P.N.A.S.*, 92, 836-840 (enero, 1995). La afinidad de unión es una expresión que se utiliza para indicar la fuerza de la interacción entre el ligando y el receptor. Para demostrar su afinidad de unión por un receptor de CRF, los péptidos de la invención pueden
40 evaluarse con facilidad utilizando un ligando marcador de afinidad conocida, tal como oCRF ¹²⁵I-radiomarcado o [D-Tyr¹², Nle^{21,38}]-r/hCRF(12-41), en experimentos de ensayo de unión que son muy conocidos en la técnica. Los resultados de estos ensayos indican la afinidad con que cada ligando se une a un receptor de CRF, expresada en términos de K_i, una constante de afinidad de unión inhibitoria relativa a dicho patrón conocido. Se determina la K_i (constante de afinidad de unión inhibitoria) utilizando un “patrón” o ligando radiactivo “marcador” y, por tanto, se
45 mide el desplazamiento del marcador del receptor o proteína de unión; se expresa de forma más adecuada haciendo referencia a dicho marcador. Sin embargo, si estos ensayos se realizan cuidadosamente bajo condiciones específicas con concentraciones relativamente bajas de receptor o similar, la K_i calculada será sustancialmente la misma que su constante de disociación K_D. La constante de disociación K_D representa la concentración de ligando necesaria para ocupar la mitad (50%) de los sitios de unión de un receptor o similares. Resulta particularmente eficaz ensayar la K_i
50 porque sólo es necesario marcar un único marcador, por ejemplo radioyodar. Un ligando concreto que tenga una alta afinidad de unión por un receptor de CRF requerirá la presencia de muy poco ligando para unirse al menos a 50% de los sitios de unión disponibles, de forma que el valor de K_D para este ligando y receptor será un número pequeño. Por otra parte, un ligando concreto que tenga una baja afinidad de unión por un receptor de CRF concreto requerirá la presencia de un nivel relativamente alto del ligando para unirse al menos a 50% de los sitios, de forma que el valor de
55 K_D para este ligando y receptor será un número grande.

Con respecto a una proteína receptora concreta, un péptido análogo de CRF que tenga una K_D de aproximadamente 10 nM o menor significa que se requerirá una concentración del ligando (es decir, el péptido análogo de CRF) no mayor que aproximadamente 10 nM para ocupar al menos 50% de los sitios de unión activos de la proteína receptora. Estos valores pueden determinarse bastante bien a partir de los resultados obtenidos utilizando un patrón
60 radioyodado y no más de aproximadamente 0,8 nM del receptor (aproximadamente 10-20 pmol de receptor/mg de proteína de membrana). Los péptidos preferidos proporcionados por esta invención tienen una afinidad de unión (K_D) tal que se requiere una concentración de ligando de aproximadamente 10 nanomolar o menor para ocupar (o unirse a) al menos 50% de los sitios de unión del receptor, y se consideran que tienen alta afinidad. Algunos de estos péptidos análogos de CRF tienen una afinidad de unión de aproximadamente 2 mM o menor. En general, para los
65 fines de esta solicitud, una constante de disociación de aproximadamente 5 nanomolar o menor se considera una indicación de afinidad fuerte, y una K_D de aproximadamente 2 nanomolar o menor es una indicación de una afinidad muy fuerte. Como se mencionó anteriormente, se considera particularmente ventajoso que estos péptidos análogos

ES 2 322 133 T3

de CRF tengan una afinidad sustancialmente alta por CRFR1, de manera que, por tanto, sean selectivos en su efecto biológico.

Estos ensayos de unión que emplean receptores de CRF son sencillos de llevar a cabo y pueden realizarse con facilidad con péptidos sintetizados o identificados antes, para determinar si estos péptidos serán ligandos selectivos de CRFR1 eficaces. Estos ensayos de unión pueden realizarse mediante una diversidad de maneras, como bien conocen los expertos en la técnica. Un ejemplo detallada de este tipo de ensayos se indica en el artículo de Perrin, M., *et al.*, *Endocrinology*. Además, los péptidos de la presente invención que incorporan un resto tirosina radioyodado son marcadores eficaces, selectivos para el CRFR1, y pueden utilizarse en selecciones de alto rendimiento.

El siguiente ejemplo 1 indica un método preferido para sintetizar ligandos de CRFR1 de interés mediante la técnica en fase sólida. Estos ejemplos se ofrecen como ilustración y no como limitación.

Ejemplo 1

La síntesis de (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂ se realiza de una manera discontinua sobre aproximadamente 3 gramos de resina de clorhidrato de MBHA, tal como la disponible en Bachem, Inc., que tiene un intervalo de sustitución de aproximadamente 0,1 a 0,5 mmoles/gr de resina. La síntesis se realiza de forma manual sobre una resina de MBHA que tiene una sustitución de aproximadamente 0,28 mequiv. por gramo de resina utilizando un protocolo como el siguiente:

ETAPA	REACTIVOS Y OPERACIONES	TIEMPOS DE MEZCLA MIN.
1	Lavado con metanol (MeOH)	1
2	Lavado con TEA al 10%/DCM (v/v)	1
3	Lavado con metanol (MeOH)	1
4	Lavado con DCM (tres veces)	3
5	TFA al 80% más m-cresol al 5% en CH ₂ Cl ₂	10
6	Lavado con metanol (MeOH)	1
7	TEA al 10% en DCM	1
8	Lavado con MeOH	1
9	TEA al 10% en DCM	1
10	Lavado con DCM (3 veces)	3
11	BOC-aminoácidos (4 equiv. en 30 ml de DCM o de NMP, dependiendo de la solubilidad del aminoácido protegido concreto) (1 vez) más DIC (4 equiv.) en CH ₂ Cl ₂	20-30

Después de la desprotección y de la neutralización, la cadena peptídica se construye paso a paso sobre la resina. En general, se emplea 1 ó 2 mmol de aminoácido protegido con BOC en cloruro de metileno (DCM) por gramo de resina (por ejemplo, un exceso de 2-5 veces dependiendo de la sustitución de la resina), más un equivalente de DIC 2 molar en cloruro de metileno durante 20-30 minutos. Cuando se está acoplado BOC-Arg(Tos) se emplea una mezcla de NMP al 50% y cloruro de metileno. Se emplea Bzl como el grupo protector de cadena lateral de hidroxilo para Ser y Thr. Puede utilizarse P-nitrofenil éster(ONp) para activar el extremo carboxilo de Asn o Gln; por ejemplo puede acoplarse BOC-Asn(ONp) durante la noche utilizando un equivalente de HOBt en una mezcla 50% de DMF y cloruro de metileno. El grupo amido de Asn o Gln se protege con Xan cuando se emplea el acoplamiento de DIC en lugar del método del éster activo. Se emplea 2-Cl-Z como grupo protector para la cadena lateral de Lys excepto para el resto Lys que va a tomar parte en el puente de lactama, y en este caso se utiliza Fmoc para proteger Lys³⁴. Se utiliza Tos para proteger el grupo guanidino de Arg y el grupo imidazol de His, y el grupo carboxilo de la cadena lateral de Glu o Asp se protege con OChx excepto Glu³¹, que es protegido por OFm. Al final de la síntesis se obtiene la siguiente composición:

ES 2 322 133 T3

BOC-Pro-Pro-Ile-Ser(Bzl)-Leu-Asp(OChx)-Leu-Thr(Bzl)-D-Phe-His(Tos)-Leu-Leu-Arg(Tos)-Glu(OChx)-Val-Leu-Glu(OChx)-Nle-Ala-Arg(Tos)-Ala-Glu(OChx)-Gln(Xan)-Leu-Ala-Gln(Xan)-Gln(Xan)-Glu(OHf)-His(Tos)-Ser(Bzl)-Lys(Fmoc)-Arg(Tos)-Lys(2-Cl-Z)-Leu-Nle-Glu(OChx)-Ile-Ile-soporte de resina. El Xan puede haber sido parcial o totalmente retirado por el tratamiento con TFA utilizado para desbloquear el grupo protector de α -amino. El péptido-resina entonces se trata con TFA para retirar el grupo protector BOC en el N-terminal. Entonces se hace reaccionar con anhídrido acético para acetilar el resto prolina.

La ciclación (lactamización) de los restos 31 y 34 entonces se realiza mediante el método indicado anteriormente, descrito más a fondo a continuación. Después de unos lavados con diclorometano (DCM) (2x) y 1-metil-2-pirrolidiona (NMP) (2x), los grupos OHf/Fmoc de Glu³¹ y Lys³⁴, respectivamente, se retiran con piperidina al 20% en NMP (1 x 1 min, y 2 x 10 min), seguido de un lavado con NMP (2x), Et₃N al 10% en DCM (v/v) (1x), metanol (MeOH) (2x) y DCM (2x). El péptido-resina se cicla utilizando un agente de acoplamiento adecuado, por ejemplo mediante una reacción a temperatura ambiente con un exceso en dos veces de HBTU o borato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) en presencia de un exceso de diisopropiletilamina (DIEA) en NMP durante 30 minutos. Otros reactivos adecuados son muy conocidos y también se pueden emplear. Después del lavado, la ciclación puede repetirse si se desea para asegurar la conclusión. La conclusión de la reacción se confirma mediante el ensayo de ninhidrina de Kaiser, muy conocido.

El péptido cíclico-resina resultante se escinde y se desprotege mediante un tratamiento con 1,0 g de p-cresol y 15 ml de fluoruro de hidrógeno (HF) por gramo de péptido-resina, primero a -20°C durante 20 min y después a 0°C durante media hora. Después de la eliminación del HF a un vacío elevado, la resina y el péptido se lavan con éter dietílico seco, y el péptido entonces se extrae con MeCN:H₂O (60:40) más TFA al 0,1% y se separa de la resina mediante filtración.

El péptido se purifica mediante HPLC preparativa como se describe en Marki, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3178 (1981); Rivier, *et al.*, *J. Chromatography*, 288, 303-328 (1984); y Hoeger, *et al.*, *BioChromatography*, 2, 3, 134-142 (1987). Las fracciones cromatográficas se controlan cuidadosamente mediante HPLC, y sólo se reúnen las fracciones que muestran una pureza sustancial.

Para comprobar si se logra la composición precisa, el análogo de r/hCRF puede hidrolizarse en tubos al vacío sellados que contiene HCl en ebullición constante, 3 μ l de tioglicol/ml, y 1 nmol de Nle (como patrón interno) durante 9 horas a 140°C. El análisis de aminoácidos de los hidrolizados utilizando un analizador de aminoácidos Beckman 121 MB muestra una proporción de aminoácidos que confirma que se ha obtenido la estructura peptídica de 38 restos. Se emplea un análisis de MS como se indica a continuación.

Se considera que el péptido es homogéneo utilizando una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). Se somete específicamente a una RP-HPLC utilizando un sistema de HPLC Waters con una columna de 0,46 x 25 cm, cargada con sílice C₁₈ 5 μ m, con un tamaño de poro de 300 Å y tampones de TEAP a diferente pH. Se logra la desalación del péptido purificado utilizando el tampón A que es una disolución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1% que contiene 1,0 ml de TFA por 1000 ml de disolución, y tampón B que es acetonitrilo al 60%. Tiene una pureza de aproximadamente 98% medida mediante electroforesis de zona capilar (CZE). Se miden los espectros de masas mediante espectrometría de masas de ion secundario líquida (LSIMS) con un espectrómetro de masas de doble foco JEOL modelo JMS-HX110 equipado con una pistola de Cs⁺. Se emplea un voltaje de aceleración de 10 kV y un voltaje de la pistola de Cs⁺ entre 25 y 30 kV. El valor medido de 4471,33 obtenido utilizando LSIMS está de acuerdo con el valor calculado de 4470,53.

La síntesis se repite omitiendo la etapa de ciclación (es decir, protegiendo todos los restos Glu con OChx y todos los restos Lys con 2Cl-Z o simplemente desbloqueando el grupo FMOC con piperidina antes del tratamiento con HF) para producir un péptido lineal comparable.

Se realizaron ensayos de unión con células que expresaban CRFR1 humano como se describe en Chen *et al.*, *P.N.A.S.*, indicado anteriormente. Se determinaron las afinidades de los péptidos de ensayo por CRFR1 y CRFR2 expresados de forma estable en células CHO mediante desplazamiento competitivo de ¹²⁵I-(Nle²¹, Tyr³²)-CRF ovino (para CRFR1) o de [¹²⁵I-Tyr⁰]-Ucn (para CRFR2) como se describe. Los datos de al menos 3 experimentos se reunieron y se calcularon los valores de la constante de disociación inhibitoria (K_i) (95% de límite de confianza) utilizando el programa LIGAND de Munson y Rodbard (1980), *Anal. Biochem.*, 107:220-239. El hCRFR1 clonado se une al péptido cíclico con alta afinidad, según se determina mediante el desplazamiento competitivo del radioligando unido. Se determinó que la K_i era de aproximadamente 1,5(0,9-2,6) nM, que puede compararse con la de r/hCRF, de aproximadamente 0,95(0,47-2,0) nM. El péptido lineal muestra una K_i de 2,7(2,2-3,4) nmol. La diferencia resulta notable en células CHO similares transfectadas de forma estable que expresan CRFR2 humano, en las que los respectivos resultados para los péptidos cíclico y lineal fueron de 224(140-370) nM y 500(330-770) nM.

Se estudiaron los agonistas de CRF para determinar sus efectos sobre la secreción de ACTH y β -endorfina *in vitro* y también *in vivo*. Se midió la potencia *in vitro* para estimular la secreción de ACTH y β -endorfina mediante células de pituitaria de rata cultivadas, utilizando el procedimiento indicado de modo general en *Endocrinology*, 91, 562 (1972), y se comparó con oCRF sintético (el patrón de laboratorio) o con r/hCRF (un patrón alternativo). El ensayo *in vivo* se realizó utilizando el procedimiento general indicado en C. Rivier *et al.*, *Science*, 218, 377 (1982). El ensayo *in vitro* del péptido cíclico demuestra una potencia sustancialmente mayor que la del patrón (oCRF), mientras que el

ES 2 322 133 T3

péptido lineal muestra una potencia menor pero mayor que la del patrón. El péptido cíclico muestra una disminución significativa en la presión sanguínea cuando se administra de manera periférica.

Ejemplo 2

5 El péptido (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-oCRF(4-41) que tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Thr-Lys-Ala-Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Asp-Ile-Ala-NH₂ se sintetizó utilizando un procedimiento como el indicado, de modo general, en el ejemplo 1. Se retira una porción del péptido-resina antes de la ciclación, y se escinde y se desprotege para proporcionar el correspondiente péptido lineal. El péptido cíclico estimula con gran fuerza la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico. El péptido lineal tiene una bioactividad muy significativamente menor. Sin embargo, ambos péptidos se unen con gran fuerza a células CHO que expresan CRFR1 y se unen muy poco a células CHO que expresan CRFR2.

15 Ejemplo 3A

20 El péptido (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{18,21}, Glu³¹, Lys³⁴]-AHC(4-41) que tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Nle-Leu-Glu-Nle-Ala-Lys-Ala-Glu-Gln-Glu-Ala-Glu-Gln-Glu-Ala-Leu-Lys-Arg-Leu-Leu-Leu-Glu-Glu-Ala-NH₂ se sintetizó utilizando un procedimiento como el indicado, de modo general, en el ejemplo 1. Se retira una porción del péptido-resina antes de la ciclación, y se escinde y se desprotege para proporcionar el correspondiente péptido lineal. El péptido cíclico estimula con gran fuerza la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico. El péptido lineal tiene una bioactividad muy significativamente menor. Ambos péptidos se unen con gran fuerza a CRFR1 y se unen sólo muy débilmente a CRFR2.

Ejemplo 3B

30 El péptido (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{18,21}, Glu³¹, Lys³⁴]-urotensina de lamprea(4-41) que tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Ile-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Asn-Nle-Ile-Glu-Nle-Ala-Arg-Ile-Glu-Asn-Glu-Arg-Glu-Gln-Glu-Gly-Leu-Lys-Arg-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Val-NH₂ se sintetizó utilizando un procedimiento como el indicado, de modo general, en el ejemplo 1. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

35 Ejemplo 3C

40 El péptido (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-CRF porcino(4-41) que tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Asn-Phe-NH₂ se sintetizó utilizando un procedimiento como el indicado, de modo general, en el ejemplo 1. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

45 Ejemplo 3D

50 El péptido (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,37,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-CRF de pez(4-41) que tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Glu-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Nle-Nle-Glu-Ile-Phe-NH₂ se sintetizó utilizando un procedimiento como el indicado, de modo general, en el ejemplo 1. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 3E

55 El péptido (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{14,18,24}, Glu³¹, Lys³⁴]-urotensina de cresa(4-41) que tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Nle-Ser-Ile-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Nle-Leu-Arg-Asn-Nle-Ile-His-Arg-Ala-Lys-Nle-Glu-Gly-Glu-Arg-Glu-Gln-Glu-Leu-Ile-Lys-Arg-Asn-Leu-Leu-Asp-Glu-Val-NH₂ se sintetizó utilizando un procedimiento como el indicado, de modo general, en el ejemplo 1. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 3F

65 El péptido (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{18,21}, Glu³¹, Lys³⁴]-urotensina de carpa(4-41) que tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Ile-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Asn-Nle-Ile-Glu-Nle-Ala-Arg-Asn-Glu-Asn-Gln-Arg-Glu-Gln-Glu-Gly-Leu-Lys-Arg-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Val-NH₂ se sintetizó utilizando un procedimiento como el indicado, de modo general, en el ejemplo 1. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y

ES 2 322 133 T3

se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 3G

5 El péptido (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{14,18,24}, Glu³¹, Lys³⁴]-urotensina de platija(4-41) que tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Nle-Ser-Ile-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Nle-Leu-Arg-Asn-Nle-Ile-His-Arg-Ala-Lys-Nle-Glu-Gly-Glu-Arg-Glu-Gln-Glu-Gln-Ile-Lys-Arg-Asn-Leu-Leu-Asp-Glu-Val-NH₂ se sintetizó utilizando un procedimiento como el indicado, de modo general, en el ejemplo 1. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 4

15 Se realiza una síntesis como en el ejemplo 1, sustituyendo la Ser en la posición 33 por Aib (ácido 2-aminoisobutírico), para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Aib³³, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: (ciclo 31-34)Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Aib-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. Se retira una porción del péptido-resina antes de la ciclación, y se escinde y se desprotege para proporcionar el correspondiente péptido lineal. El péptido cíclico estimula con gran fuerza la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico. El péptido lineal tiene una bioactividad muy significativamente menor. Ambos péptidos se unen con gran fuerza a CRFR1 y se unen muy débilmente a CRFR2.

Ejemplo 5

25 Se realiza una síntesis como en el ejemplo 1, sustituyendo Leu¹⁵ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², CML¹⁵, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-CML-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 5A

35 Se realiza una síntesis como en el ejemplo 1, sustituyendo Leu¹⁴ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², CML¹⁴, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-CML-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 5B

45 Se realiza una síntesis como en el ejemplo 1, sustituyendo Leu¹⁹ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, CML¹⁹, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-CML-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 5C

55 Se realiza una síntesis como en el ejemplo 1, sustituyendo Leu²⁷ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML²⁷, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 5D

65 Se realiza una síntesis como en el ejemplo 1, sustituyendo Leu³⁷ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴, CML³⁷]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-CML-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

ES 2 322 133 T3

Ejemplo 5E

Se realiza una síntesis como en el ejemplo 1, sustituyendo Glu¹⁷ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², CML¹⁷, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-CML-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β-END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 5F

Se realiza una síntesis como en el ejemplo 1, sustituyendo Leu²⁷ por C^αMeLeu e His³² por D-His para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML²⁷, Glu³¹, D-His³², Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente fórmula: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-D-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β-END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 6A

Se repitió la síntesis del ejemplo 5C pero en este caso se sustituyó Leu¹⁴ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², CML^{14,27}, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente fórmula: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-CML-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β-END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 6B

Se repitió de nuevo la síntesis del ejemplo 5C pero en este caso se sustituyó también Val¹⁸ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², CML^{18,27}, Nle^{21,38}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente fórmula: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-CML-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β-END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 6C

Se repitió una vez más la síntesis del ejemplo 5C, sustituyendo también Lys³⁶ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,36}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-CML-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β-END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

La anterior síntesis se repitió en general, sustituyendo His³² por D-His, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,36}, Glu³¹, D-His³², Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-D-His-Ser-Lys-Arg-CML-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β-END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 6D

Se repitió la síntesis del ejemplo 5C pero sustituyendo Leu³⁷ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,37}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-CML-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β-END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 6E

Se repitió de nuevo la síntesis del ejemplo 5C pero en este caso se sustituyó también Ile⁴⁰ por C^αMeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂, y también su homólogo lineal.

ES 2 322 133 T3

Se confirmó una pureza de aproximadamente 95% para todos los péptidos mediante HPLC y mediante electroforesis de zona capilar (CZE) y se confirma su identidad mediante espectroscopía de masas (MS). El valor medido de 4498,32 obtenido utilizando una espectrometría de masas de ion secundario líquida (LSIMS) para el péptido cíclico está de acuerdo con el valor calculado de 4498,56. El péptido lineal tiene un valor medido de 4516,45, que se corresponde con el valor calculado de 4516,57.

Se realizaron ensayos de unión con células que expresaban CRFR1 humano como se describe con respecto al ejemplo 1. Los datos de al menos 3 experimentos se reunieron y se calcularon los valores de la constante de disociación inhibitoria (K_i) (95% de límite de confianza) utilizando el programa LIGAND de Munson y Rodbard (1980), *Anal. Biochem.*, 107:220-239. El hCRFR1 clonado se une al péptido cíclico con alta afinidad, según se determina mediante el desplazamiento competitivo del radioligando unido. El péptido lineal muestra una K_i ligeramente mayor. La diferencia resulta significativa en células CHO similares transfectadas de forma estable que expresan CRFR2 humano, en las que los respectivos resultados para los péptidos cíclico y lineal muestran que ambos se unen sólo muy débilmente. El péptido cíclico estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 6F

Se repitió de nuevo la síntesis del ejemplo 5C pero en este caso se sustituyó también Ile⁴¹ por C ^{α} MeLeu, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,41}, Glu³¹, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-CML-NH₂. El péptido cíclico se une con gran fuerza a CRFR1 y se une sólo muy débilmente a CRFR2. Estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 6G

Se repitió la síntesis del ejemplo 6E pero en este caso se sustituyó también Ser³³ por Aib, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, Aib³³, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-Aib-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂, y también su homólogo lineal.

Se confirmó una pureza de aproximadamente 98% para todos los péptidos mediante HPLC y mediante electroforesis de zona capilar (CZE) y se confirma su identidad mediante espectroscopía de masas (MS). El valor medido de 4496,20 obtenido utilizando una espectrometría de masas de ion secundario líquida (LSIMS) para el péptido cíclico está de acuerdo con el valor calculado de 4496,58. El péptido lineal tiene un valor medido de 4514,45, que se corresponde con el valor calculado de 4514,59.

Se realizaron ensayos de unión con células que expresaban CRFR1 humano como se describe con respecto al ejemplo 1. El hCRFR1 clonado se une al péptido cíclico con alta afinidad, según se determina mediante el desplazamiento competitivo del radioligando unido. El péptido lineal muestra una K_i ligeramente mayor. La diferencia resulta significativa en células CHO similares transfectadas de forma estable que expresan CRFR2 humano, en las que los respectivos resultados para los péptidos cíclico y lineal muestran que ambos se unen sólo muy débilmente. El péptido cíclico estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 6H

Se repitió de nuevo la síntesis del ejemplo 6E pero en este caso se sustituyó también Ser³³ por D-Ser, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, D-Ser³³, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-D-Ser-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂, y también su homólogo lineal.

Se confirmó una pureza de aproximadamente 96% para todos los péptidos mediante HPLC y mediante electroforesis de zona capilar (CZE) y se confirma su identidad mediante espectroscopía de masas (MS). El valor medido de 4498,46 obtenido utilizando una espectrometría de masas de ion secundario líquida (LSIMS) para el péptido cíclico está de acuerdo con el valor calculado de 4498,56. El péptido lineal tiene un valor medido de 4516,27, que se corresponde con el valor calculado de 4516,57.

Se realizaron ensayos de unión con células que expresaban CRFR1 humano como se describe con respecto al ejemplo 1. El péptido lineal muestra una K_i ligeramente mayor. La diferencia resulta significativa en células CHO similares transfectadas de forma estable que expresan CRFR2 humano, en las que los respectivos resultados para los péptidos cíclico y lineal muestran que ambos se unen sólo muy débilmente. El péptido cíclico estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

Ejemplo 6I

Se repitió la síntesis del ejemplo 6E pero en este caso se substituyó también Ser³³ por D-Ala, para producir el siguiente péptido: (ciclo 31-34)[Ac-Pro⁴, D-Phe¹², Nle^{21,38}, CML^{27,40}, Glu³¹, D-Ala³³, Lys³⁴]-r/hCRF(4-41), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: Ac-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Gln-Glu-His-D-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂, y también su homólogo lineal.

Se confirmó una pureza de aproximadamente 97% para los péptidos mediante HPLC y mediante electroforesis de zona capilar (CZE) y se confirma su identidad mediante espectroscopía de masas (MS). El valor medido de 4482,47 obtenido utilizando una espectrometría de masas de ion secundario líquida (LSIMS) para el péptido cíclico está de acuerdo con el valor calculado de 4482,57. El péptido lineal tiene un valor medido de 4500,61, que se corresponde con el valor calculado de 4500,58.

Se realizaron ensayos de unión con células que expresaban CRFR1 humano como se describe con respecto al ejemplo 1. El hCRFR1 clonado se une al péptido cíclico con alta afinidad, según se determina mediante el desplazamiento competitivo del radioligando unido. El péptido lineal muestra una K_i ligeramente mayor. La diferencia resulta significativa en células CHO similares transfectadas de forma estable que expresan CRFR2 humano, en las que los respectivos resultados para los péptidos cíclico y lineal muestran que ambos se unen sólo muy débilmente. El péptido cíclico estimula la secreción de ACTH y β -END-LI y provoca una disminución muy significativa de la presión sanguínea cuando se administra de modo periférico.

El CRF estimula profundamente el eje pituitario-adrenocortical y actúa dentro del cerebro mediando en una amplia variedad de respuestas al estrés. Estos agonistas de CRF deberían ser útiles para estimular las funciones de este eje en algunos tipos de pacientes con baja producción endógena de glucocorticoides; por ejemplo, deberían ser útiles para restablecer la función pituitaria-adrenal en pacientes que hayan recibido una terapia con glucocorticoides exógena cuyas funciones pituitaria-adrenocorticales permanecen suprimidas.

Mejora del aprendizaje y de la memoria

Como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona métodos para mejorar el aprendizaje y la memoria mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando de CRFR1. Estos pacientes pueden identificarse mediante un diagnóstico clínico basado en los síntomas de la demencia o en la pérdida de memoria y capacidad de aprendizaje. Los individuos con un trastorno amnésico tienen mermada su capacidad para aprender nueva información o son incapaces de recordar información aprendida con anterioridad o acontecimientos del pasado. El déficit de memoria es más evidente en las tareas que requieren el recuerdo espontáneo y también puede resultar evidente cuando el examinador proporciona estímulos a la persona para que pueda recordarlos después. El trastorno de la memoria debe ser suficientemente grave como para provocar un deterioro marcado en el funcionamiento social o laboral y debe representar un descenso significativo desde un nivel de funcionamiento previamente mayor. El déficit de la memoria puede estar relacionado con el envejecimiento o puede ser el resultado de una enfermedad o de otra causa.

La demencia se caracteriza por múltiples déficits clínicamente significativos en la cognición que representan un cambio significativo desde un nivel de funcionamiento previamente mayor. Se requiere un deterioro de la memoria que implique una incapacidad para aprender nuevos materiales u olvidar un material previamente aprendido para realizar un diagnóstico de demencia. La memoria puede ensayarse de modo formal pidiendo a la persona que comprenda, mantenga, recuerde y reconozca información. El diagnóstico de la demencia también requiere al menos uno de los siguientes trastornos cognitivos: afasia, apraxia, agnosia o trastornos en el funcionamiento ejecutivo. Estos déficits en el lenguaje, la actuación motora, el reconocimiento de objetos y el pensamiento abstracto, respectivamente, deben ser suficientemente graves junto con el déficit de memoria para provocar un deterioro en el funcionamiento social o laboral, y deben representar un descenso significativo desde un nivel de funcionamiento previamente mayor.

Además, puede utilizarse una serie de ensayos bioquímicos que correlacionan los niveles de CRF con un deterioro en el aprendizaje y en la memoria. Por ejemplo, el nivel de CRF libre en el fluido cerebroespinal puede medirse mediante ELISA o RIA. Además, o en lugar de los ensayos, puede utilizarse la formación de imágenes cerebrales como se describe con un ligando marcado específico de CRF-BP o del receptor de CRF para cuantificar el receptor libre o CRF-BP permitiendo, con ello, saber si el CRF libre ha disminuido. Por último, la formación de imágenes cerebrales con un ligando específico de CRF no unido puede utilizarse para ensayar directamente la cantidad de CRF libre en el cerebro.

El estado minimal del paciente se registra con el Ensayo Minimal para el Aprendizaje y la Memoria, un ensayo convencional utilizado por los médicos para determinar si un paciente tiene un deterioro en la capacidad de aprendizaje y en la memoria (Folstein *et al.*, J. Psychiatric Res., 12:185, 1975). Este ensayo implica una serie de tareas sencillas y preguntas escritas. Por ejemplo, la capacidad de aprendizaje "de asociación de parejas" está deteriorado en pacientes amnésicos de varios tipos, incluyendo los que sufren traumatismos cefálicos, enfermedad de Korsakoff o accidentes cerebrovasculares (Squire, 1987). A un paciente se le leen diez parejas de palabras no relacionadas (por ejemplo, ejército-mesa). Entonces se pide a los pacientes que recuerden la segunda palabra cuando se le repite la primera palabra de cada pareja. La medida del deterioro de la memoria es un número reducido de palabras asociadas

con la pareja recordadas con relación a un grupo control homólogo. Esto sirve como un índice de la memoria de trabajo a corto plazo del tipo que se deteriora con rapidez en las etapas tempranas de los trastornos de demencia o amnésicos.

La mejora en el aprendizaje y en la memoria constituye (a) una diferencia estadísticamente significativa entre la actuación de pacientes tratados con inhibidor del ligando comparados con un grupo con placebo; o (b) un cambio estadísticamente significativo en la actuación en la dirección de la normalidad en medidas pertinentes al modelo de enfermedad. Esta estrategia se ha empleado con éxito para identificar colinomiméticos terapéuticamente útiles para la mejora de la memoria. Los modelos animales o los casos clínicos de enfermedad muestran síntomas que, por definición, pueden distinguirse de los controles normales. Por tanto, la medida de la farmacoterapia eficaz será una reversión significativa, pero no necesariamente completa, de los síntomas. La mejora puede facilitarse en modelos animales y humanos de patologías de la memoria mediante fármacos “potenciadores cognitivos” clínicamente eficaces, que sirven para mejorar el rendimiento de una tarea relacionada con la memoria. Por ejemplo, los potenciadores cognitivos que actúan como terapias de sustitución colinomiméticas en pacientes que padecen demencia y pérdida de memoria de tipo Alzheimer mejoran significativamente la memoria de trabajo a corto plazo en paradigmas como las tareas de asociación de parejas (Davidson y Stem, 1991). Se intuye otra aplicación potencial para las intervenciones terapéuticas contra el deterioro de la memoria por los déficits en las actuaciones relacionados con el envejecimiento, de los cuales pueden construirse unos modelos eficaces mediante el estudio longitudinal de la memoria reciente en ratones envejecidos (Forster y Lal, 1992).

En animales están disponibles varios modelos establecidos de aprendizaje y memoria para estudiar los efectos benéficos potenciadores cognitivos y los potenciales efectos secundarios relacionados con la ansiedad de la activación de neuronas sensibles al CRF. Los efectos potenciadores cognitivos se miden mediante el laberinto de Morris (Stewart y Morris, en *Behavioral Neuroscience*, R. Saghal, ed. (IRL Press, 1993), p. 107) y el laberinto en forma de Y (Brits *et al.*, *Brain Res. Bull.*, 6, 71 (1981), el ensayo de evitación activa de una vía, y el ensayo de la evitación pasiva de dos vías; los efectos relacionados con la ansiedad se evalúan en el laberinto elevado en cruz (Pellow *et al.*, *J. Neurosci. Meth.*, 14:149, 1985).

El laberinto de agua de Morris es uno de los modelos mejor validados de aprendizaje y memoria, y es sensible a los efectos potenciadores cognitivos de una diversidad de agentes farmacológicos (McNamara y Skelton, *Brain Res. Rev.*, 18:33, 1993). La tarea realizada en el laberinto es particularmente sensible a las manipulaciones del hipocampo en el cerebro, una área del cerebro importante para el aprendizaje espacial en animales y para la consolidación de la memoria en seres humanos. Además, la mejora en la actuación en el laberinto de agua de Morris es predictiva de la eficacia clínica de un compuesto como potenciador cognitivo. Por ejemplo, el tratamiento con inhibidores de colinesterasa o agonistas colinérgicos muscarínicos selectivos revierte los déficits en el aprendizaje en el modelo animal de aprendizaje y memoria del laberinto de Morris, así como en poblaciones clínicas con demencia (McNamara y Skelton, 1993; Davidson y Stem, 1991; McEntee y Crook, 1992; Dawson *et al.*, 1992). Además, este paradigma animal es un modelo preciso del grado creciente de deterioro a medida que avanza el envejecimiento (Levy *et al.*, 1994) y de la mayor vulnerabilidad del rastro de la memoria hasta un retraso preensayo o interferencia (Stewart y Morris, 1993), que es característico de pacientes amnésicos.

El ensayo es una tarea de aprendizaje espacial sencilla en que el animal se coloca en agua tibia, que es opaca debido a la adición de leche en polvo. Los animales aprenden la localización de la plataforma con relación a pistas visuales colocadas dentro del laberinto y el cuarto de ensayo; este aprendizaje se denomina aprendizaje de sitio.

Como se analizará con más detalle a continuación, 15 minutos antes del entrenamiento en cada uno de los días 1-3, los grupos de animales recibieron por vía oral una disolución control o una dosificación del inhibidor de ligando. Los animales control alcanzan la plataforma de forma típica en cinco a diez segundos después de tres días de entrenamiento. La medida de los efectos moduladores de la memoria de un inhibidor de ligando es un desplazamiento de este periodo de tiempo. La administración de un inhibidor de ligando produce un aumento dependiente de la dosis en la disponibilidad del CRF sináptico y un aumento (cambio en el comportamiento) dependiente de la dosis en la adquisición de información y la retención de la memoria.

El ensayo del laberinto en forma de Y basado en la discriminación visual es otro ensayo del aprendizaje y la memoria en animales. En este laberinto, dos ramas del laberinto terminan en un panel de plástico translúcido tras el cual hay una bombilla de 40 vatios. La caja de salida está separada de la tercera rama por una puerta de guillotina activada de forma manual. En el primer ensayo se deja que todos los animales exploren el laberinto durante 5 minutos y pueden conseguir pienso en todas las ramas. El segundo día cada animal se coloca en la caja de salida con la puerta cerrada. Cuando se abre la puerta se deja que el animal se mueva por las ramas y se coma el pienso que está en ambas ramas. El tercer día los animales realizan seis ensayos en grupos de tres, en los que una rama está cerrada en el punto de cruce, no hay estímulos discriminativos presentes, y hay dos piensos disponibles en la caja de meta abierta. En los días 4-10, se ilumina una luz al final de la rama con el pienso y se realizan diez ensayos, de nuevo en grupos de tres. Se registra el tiempo que tarda el animal en alcanzar el pienso.

La eficacia de un inhibidor de ligando para mejorar el aprendizaje y la memoria en el laberinto en forma de Y se ensaya como sigue. Quince minutos antes de cada uno de los bloques de ensayos de entrenamiento en los días 4-10, grupos de animales reciben por vía oral disoluciones control o dosis de un inhibidor de ligando. Se espera que los animales control hagan 50% de elecciones correctas. La medida de la eficacia del tratamiento sobre la memoria es un aumento en las respuestas correctas.

ES 2 322 133 T3

El ensayo de evitación activa de una vía es otro ensayo del aprendizaje y la memoria en animales. Puede utilizarse para evaluar la mejora en déficits de la memoria relacionados con el envejecimiento. Un animal se coloca en un compartimento de estimulación eléctrica plantar; una puerta que se abre hacia un compartimento seguro actúa como señal para la evitación. Brevemente, en este ensayo se encierra a un animal en una caja Skinner que contiene un suelo en rejilla compuesto de barras de acero inoxidable. Un generador de luz y tono de 7 vatios en cada extremo de la caja actúa como estímulo condicionado. Una rata o un ratón primero se entrena colocándolo en el compartimento de estimulación eléctrica plantar de espaldas a la puerta. Se administra un choque eléctrico con la apertura simultánea de la puerta hacia el compartimento seguro. El ensayo se repite a intervalos, sólo que el choque eléctrico se retrasa 10 segundos después de abrir la puerta. Se registra el tiempo que tarda el animal en abandonar el compartimento de estimulación eléctrica plantar.

La eficacia de un inhibidor de ligando para mejorar la memoria y el aprendizaje en la evitación de una vía o con disolución control se ensaya como sigue. A los animales se les administra el inhibidor de ligando 15 minutos antes del entrenamiento. Veinticuatro horas después los grupos se ensayan para la retención, sin que se vuelva a administrar el inhibidor de ligando. La medida de la eficacia es un tiempo de latencia menor para abandonar el compartimento de estimulación eléctrica plantar.

El ensayo de evitación pasiva de dos vías es otro ensayo de aprendizaje y de memoria. Se coloca a un animal en el compartimento seguro de la caja Skinner y cuando entra en el compartimento de estimulación eléctrica plantar la puerta se cierra y se administra un choque eléctrico suave. Se registra el tiempo de latencia para entrar en el segundo compartimento. La memoria se ensaya de 1 a 7 días después. En este momento no se administra un choque eléctrico.

La eficacia de un inhibidor de ligando para mejorar el aprendizaje y la memoria se ensaya como sigue. Inmediatamente antes del entrenamiento, grupos de animales reciben por vía oral disoluciones control o dosis del inhibidor de ligando. Entonces se determina el tiempo de latencia para entrar en el compartimento de estimulación eléctrica plantar.

El ensayo del laberinto elevado en cruz mide las respuestas ansiogénicas en una situación de aproximación-evitación que implica un espacio expuesto e iluminado frente a un espacio cerrado y oscuro. Ambos espacios están elevados y están montados como dos pistas que se cortan para formar una cruz. Este tipo de situación de aproximación-evitación es un ensayo clásico de "emotividad" y es muy sensible a tratamientos que producen desinhibición y estrés. Los animales se colocan en el centro del laberinto y se les permite moverse por las cuatro ramas durante un periodo de tiempo de ensayo de cinco minutos. Se registra el tiempo que permanecen en cada rama.

En seres humanos, los métodos para mejorar el aprendizaje y la memoria pueden medirse mediante ensayos como la escala de memoria Wechsler o las tareas de memoria de asociación de parejas. La escala de memoria Wechsler es un ensayo de la función cognitiva y la capacidad de memoria que se realiza con lápiz y papel y se emplea con amplitud. En una población normal, el ensayo estandarizado produce una media de 100 y una desviación estándar de 15, de forma que puede detectarse una amnesia suave con una reducción en 10-15 puntos en esta puntuación, una amnesia más grave con una reducción en 20-30 puntos y así (Squire, 1987). Durante la entrevista clínica, se aplica una batería de ensayos que incluyen, pero no se limitan al ensayo minimalista, la escala de memoria Wechsler o el aprendizaje de asociación de parejas para diagnosticar la pérdida de memoria sintomática. Estos ensayos proporcionan una sensibilidad general para el deterioro cognitivo general y la pérdida específica de capacidad de aprendizaje/memoria (Squire, 1987). Aparte de los diagnósticos específicos de demencia o trastornos amnésicos, estos instrumentos clínicos también identifican el deterioro cognitivo relacionado con el envejecimiento que refleja una disminución objetiva en la función mental como consecuencia del proceso de envejecimiento que está dentro de los límites normales de la edad del paciente (DSM IV, 1994). Como se indicó anteriormente, una "mejora" en el aprendizaje y la memoria está presente, dentro del contexto de la presente invención, si existe una diferencia estadísticamente significativa en la dirección de la normalidad en el ensayo de asociación de parejas, por ejemplo, entre la actuación de pacientes tratados con el inhibidor de ligando cuando se compara con los miembros del grupo con placebo, o entre ensayos posteriores realizados con el mismo paciente.

Disminución de la ingesta de alimento

Como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona métodos para disminuir la ingesta de alimento mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando de CRFR1. Se ha demostrado que el CRF es un importante modulador de la ingesta de alimento. Por ejemplo, la administración de agonistas de CRF o las condiciones que elevan los niveles de CRF endógenos (por ejemplo, el estrés) disminuyen la ingesta de alimento (Appel *et al.*, *Endoc.*, 128:3237, 1991; Krahn y Gosnell, *Psychiat. Med.*, 7:235, 1989; McCarthy *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 264:E638, 1993). Por tanto, la administración de CRF produce una disminución significativa en la ingesta nocturna de alimento (Gosnell *et al.*, *Peptides*, 4:807, 1983), una disminución del peso corporal en ratas (Hotta *et al.*, *Life Sci.*, 48:1483, 1991) y una respuesta de aumento de la temperatura en el tejido adiposo marrón (LeFeuvre *et al.*, *Neuropharmacol.*, 26:1217, 1987). Además, el neuropéptido Y (NPY), que es el estímulo más potente conocido de ingesta de alimento, puede ver potenciado su efecto con la coadministración de un ligando del receptor de CRF.

Los pacientes pueden identificarse como obesos. Un individuo obeso pesa más que un peso diana considerado normal para la edad, el género y la altura de esa persona, y puede identificarse objetivamente mediante el índice de masa corporal (IMC, calculado como el peso en kilogramos/altura en metros²) del 85º percentil o mayor que la misma población de referencia (National Center for Health Statistics, "Obese and Overweight Adults in the United States",

serie 11, nº B0, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1983). Además, pueden obtenerse pruebas de que el CRF está implicado en un individuo concreto demostrando unos menores niveles de CRF en el fluido cerebroespinal o mediante formación de imágenes cerebrales como se indicó anteriormente. Debido a que el hipotálamo es un área cerebral habitual en la mediación de los efectos del CRF sobre la ingesta de alimento y los parámetros endocrinos, las alteraciones en la concentración de la hormona pituitaria también pueden reflejar los niveles alterados del CRF hipotalámico.

Una disminución en la ingesta de alimento puede medirse por el retraso en el inicio de la comida y la reducción en la duración global o cantidad de alimento consumido (Smith, "Satiety and the Problem of Motivation", en D.W. Pfaff (ed.), *The Physiological Mechanisms of Motivation*, Springer-Verlag, Nueva York, pp. 133-143, 1982). Además, la selección de nutrientes particulares en una situación de elección de alimento actúa como una medida suplementaria del hambre específica (Rozin, *Adv. Study Behav.*, 6:21, 1976).

Existen dos modelos animales establecidos de regulación del apetito. Uno es una medida simple de ingesta de alimento, y el segundo es una medida de autoselección de la dieta en un entorno de un comedor. En el primer método, la ingesta de alimento se limita durante 24 horas, seguidas de dos horas de acceso a una porción prepesada de pienso de laboratorio en la propia jaula del animal. Se mide la ingesta de alimento a los 60 y 120 minutos pesando el pienso remanente. Estos ensayos también pueden realizarse en animales que son obesos debido a mutaciones genéticas y que reproducen de forma eficaz los síntomas de la sobrealimentación y las perturbaciones en la selección de nutrientes (Argiles, *Prog. Lipid Res.*, 28:53, 1989; Wilding *et al.*, *Endocrinol.*, 132:1939, 1993).

En el entorno de un comedor, las dietas se formulan especialmente con diferentes proporciones de macronutrientes, tales como carbohidratos, proteínas y grasas, para poder medir la preferencia por nutrientes específicos basándose en lo sensorialmente atractivo o el beneficio postingesta. La selección de la dieta se altera, en parte, debido a una amplia variedad de sistemas neuroquímicos. Estos ensayos son útiles para la detección de cambios sutiles en la regulación de la ingesta de alimento que impactan en fenómenos, como las ansias de comer o los atracones, y son pertinentes para el diagnóstico de trastornos alimentarios, como la anorexia nerviosa y la obesidad. Después de establecer una línea de base para los animales, 15 minutos antes del ensayo cada animal recibe una dosis oral de un inhibidor de ligando. Se mide la ingesta de alimento como se describió para el ensayo de alimentación o la autoselección de la dieta en el entorno de un comedor, y los resultados del ensayo se comparan con la línea de base. Además, la sobrealimentación en un modelo animal de privación de nicotina y en ratas genéticamente obesas (raza Zucker) proporcionan otros modelos para ensayar el efecto de un inhibidor de ligando sobre la regulación del apetito. Brevemente, en el modelo de privación de nicotina, a los animales se les administra nicotina de forma crónica. Estos animales muestran una inhibición de la ganancia normal de peso y una reducción en la ingesta de agua y alimento. Cuando cesa el tratamiento con nicotina, los animales aumentan significativamente su peso corporal y la ingesta de alimento y agua. El efecto de los inhibidores de ligandos sobre el apetito durante la privación de nicotina se evalúa administrando el inhibidor de ligando tres días después del cese de la administración de nicotina.

Se ha descubierto una base genética para la sobrealimentación en ratones (por ejemplo, ob/ob) y en ratas (raza Zucker; fa/fa). Estos animales ofrecen otros modelos de sobrealimentación para evaluar la eficacia de los inhibidores de ligandos. En particular, se emplean ratas Zucker como sujetos. Se tratan grupos de ratas con vehículo o con inhibidor de ligando a diario a través de un periodo de tiempo fijado, como una semana. Se mide la posterior ganancia de peso o ingesta de alimento. Las ratas Zucker normales (no genéticamente obesas) actúan como control. La administración de un inhibidor de ligando reduce la ingesta de alimento y la ganancia de peso corporal con relación a las ratas normales.

En seres humanos, la obesidad no sólo está relacionada con la sobrealimentación sino que también puede estar relacionada con el consumo de dietas nutricionalmente desequilibradas, tales como una ingesta desproporcionadamente alta de comidas dulces o grasas (Drewnowski *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 46:442, 1987). Por tanto, las manifestaciones clínicas de la regulación del apetito pueden detectarse con facilidad utilizando dietas experimentales controladas o protocolos de autoselección en un comedor que registren los patrones de ingesta en términos de cantidad, duración de la comida y elección (Kissileff, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 8:129, 1984). En estos ensayos, tras la determinación de una línea de base para cada individuo, se realizan las medidas de la ingesta de alimento o de la autoselección en el entorno de un comedor. La mejora en el contexto del tratamiento de la obesidad constituye una pérdida de peso o una reducción en la ingesta de alimento mostrada por los pacientes tratados comparados con los miembros de un grupo con placebo. Además esta estrategia ha resultado muy satisfactoria para la identificación de agonistas serotoninérgicos para la obesidad.

Enfermedades asociadas con bajos niveles de CRF

Como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona métodos para tratar enfermedades asociadas con bajos niveles de CRF mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de ligando de un complejo CRF/CRF-BP. Estos pacientes pueden identificarse mediante el diagnóstico de trastornos alimentarios, trastornos neuroendocrinos, y trastornos cognitivos, como la enfermedad de Alzheimer. Además, otros trastornos asociados con una disminución en los niveles de CRF, tales como la depresión atípica, la depresión estacional, el síndrome de fatiga crónica, la obesidad, la vulnerabilidad a enfermedades inflamatorias, el trastorno de estrés postraumático y la privación de psicoestimulantes a menudo presentan un perfil de hipotiroidismo y una disminución de la actividad del sistema de estrés que se identifica, de modo característico, por una disminución en el cortisol urina-

rio libre y el ACTH plasmático. Por tanto, estas enfermedades y trastornos probablemente puedan resolverse, en parte, por el restablecimiento o la potenciación de los niveles de CRF cerebrales (Chrousos y Gold, JAMA, 267:1244, 1992).

5 El signo característico de este conjunto diverso de estados de enfermedad humanas es la disregulación del eje pituitario-adrenal con un probable trastorno en el CRF cerebral. Por tanto, el hecho de que la alteración experimental de los sistemas de CRF/pituitario-adrenal en animales de laboratorio reproduce las características esenciales de los anteriores síndromes, a saber, un comportamiento desesperado (Pepin *et al.*, 1992), fatiga con el ejercicio (Rivest y Richard, 1990), obesidad (Rothwell, 1989) y un estado de hiperalerta asociado con la privación de psicoestimulantes (Koob *et al.*, 1993; Swerdlow *et al.*, 1991) sugiere la amplia utilidad de farmacoterapias diseñadas para normalizar los niveles endógenos de CRF.

15 La característica esencial de la depresión estacional (trastorno depresivo grave con un patrón estacional) es la aparición y la remisión de episodios depresivos graves en momentos característicos del año. En la mayoría de los casos, los episodios depresivos graves que aparecen con un patrón estacional a menudo se caracterizan por una anergia prominente, hipersomnía, sobrealimentación, ganancia de peso y unas ansias por carbohidratos, y deben persistir durante un periodo de al menos dos semanas durante las cuales se presenta un estado de ánimo deprimido o la pérdida de interés o placer en casi todas las actividades.

20 La característica esencial del trastorno de estrés postraumático es el desarrollo de unos síntomas característicos tras la exposición a un factor de estrés traumático extremo que implica la experiencia personal directa de un acontecimiento que implique la muerte real o la amenaza de muerte o lesiones graves para sí mismo o para la integridad física de otra persona. La respuesta de la persona al acontecimiento debe implicar miedo intenso, impotencia u horror. El acontecimiento traumático se reexperimenta como recuerdos intrusivos o pesadillas que disparan una angustia psicológica o una reactividad fisiológica intensas. El cuadro de síntomas completo debe estar presente durante más un mes y provocar una angustia clínicamente significativa o un deterioro en el funcionamiento social o laboral.

30 La característica esencial de la privación de nicotina (trastorno inducido por la nicotina) es la presencia de un síndrome de abstinencia característico que se desarrolla después del cese abrupto o de la reducción en el uso de productos que contienen nicotina después de un periodo prolongado (al menos varias semanas) de uso diario. El diagnóstico de la privación de nicotina requiere la identificación de cuatro o más de los siguientes: estado de ánimo disfórico o deprimido, insomnio, irritabilidad o ira, ansiedad, dificultad para concentrarse, agitación o impaciencia, disminución en la frecuencia cardíaca y aumento del apetito o ganancia de peso. Estos síntomas deben provocar una angustia clínicamente significativa o un deterioro en el funcionamiento social o laboral.

35 La mejora constituye (a) un cambio estadísticamente significativo en la condición sintomática de un individuo tratado comparado con una condición de línea de base o pretratamiento en las medidas pertinentes al modelo de enfermedad; o (b) una diferencia estadísticamente significativa en la condición sintomática de los pacientes tratados con el inhibidor de ligando y los miembros de un grupo con placebo. Los casos clínicos de enfermedad muestran síntomas que, por definición, son distinguibles de los controles normales. Para la depresión se utilizan varias escalas de puntuación de la depresión (véase Klerman *et al.*, Clinical Evaluation of Psychotropic Drugs: Principles and Guidelines, Prien y Robinson (eds.), Raven Press, Ltd., Nueva York, 1994). Un ensayo, la escala de puntuación Hamilton para la depresión, se utiliza ampliamente para evaluar la depresión y también se utiliza para evaluar los cambios en los síntomas en respuesta a un tratamiento. Otros ensayos y puntuaciones pueden obtenerse en el manual DSM-IV. Para la privación de nicotina, así como para otros trastornos, pueden encontrarse ensayos para la evaluación de la gravedad del trastorno en el manual DSM-IV.

Enfermedad de Alzheimer

50 Como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer ("EA") mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando de CRFR1. Estos pacientes pueden identificarse mediante un diagnóstico clínico basado en los síntomas de la demencia o la pérdida de capacidad de aprendizaje y de memoria que no son atribuibles a otras causas. Además, los pacientes también se identifican mediante el diagnóstico de atrofia cerebral según se determina mediante la formación de imágenes de resonancia magnética.

55 Se ha demostrado que unos menores niveles de CRF están implicados en la enfermedad de Alzheimer. Se eligieron para su estudio cerebros obtenidos postmortem de diez individuos con EA y diez controles neurológicamente normales. Las áreas convencionales del polo frontal, polo parietal, polo temporal y polo occipital se diseccionaron del cerebro fresco, se congelaron en hielo seco y se conservaron a -70°C hasta que se procesaron para un radioinmunoensayo de CRF y un ensayo de CRF-BP. Muestras fijadas en formaldehído de la corteza cerebral y del hipocampo se introdujeron en parafina y posteriormente se cortaron secciones y se tiñeron con hematoxilina/eosina y se impregnaron con plata. El examen de las secciones teñidas de cerebros de pacientes EA mostraron numerosas placas neuróticas y madejas neurofibrilares típicas de la EA, mientras que los casos control no mostraron ninguna.

65 Están disponibles varios modelos animales establecidos de la enfermedad de Alzheimer que se centran en los déficits colinérgicos. El papel principal de los déficits colinérgicos en la EA está bien establecido. En la EA, existen significativas correlaciones positivas entre una menor actividad de la colina acetiltransferasa y unos menores niveles de CRF en los lóbulos frontal, occipital y temporal (DeSouza *et al.*, 1986). De forma similar, existen correlaciones

negativas entre una menor actividad colina acetiltransferasa y un mayor número de receptores de CRF en estas tres cortezas (id.). En otras dos enfermedades neurodegenerativas, existen correlaciones muy significativas entre CRF y actividad colina acetiltransferasa en la enfermedad de Parkinson, pero sólo una ligera correlación en la parálisis supranuclear progresiva (Whitehouse *et al.*, 1987).

5 En ratas, estudios anatómicos y de comportamiento prueban que existen interacciones entre el CRF y los sistemas colinérgicos. En primer lugar, en algunos núcleos del tronco cerebral se colocan el CRF y la acetil colinesterasa, y algunas neuronas colinérgicas también contienen CRF. En segundo lugar, el CRF inhibe los comportamientos inducidos por carbacol (el carbacol es un antagonista del receptor colinérgico muscarínico), lo cual sugiere que el CRF tiene efectos sobre los sistemas colinérgicos (Crawley *et al.*, Peptides, 6:891, 1985). El tratamiento con otro antagonista del receptor colinérgico muscarínico, la atropina, produce un aumento en los receptores de CRF (DeSouza y Battaglia, Brain Res., 397:401, 1986). Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que el CRF y los sistemas colinérgicos interactúan de forma similar en seres humanos y en animales.

15 Un modelo animal de la enfermedad Alzheimer que se centra en los déficits colinérgicos puede producirse por la administración de escopolamina, un antagonista del receptor muscarínico postsináptico no selectivo que bloquea la estimulación de los receptores postsinápticos por la acetilcolina. En estos animales, los déficits de la memoria pueden apreciarse con facilidad midiendo la evitación pasiva o con ensayos de no-alternancia forzada, que distinguen entre los déficits motores o perceptivos y la amnesia o los efectos potenciadores cognitivos de tratamientos experimentales. Por tanto, el laberinto de Morris y los ensayos de laberintos en forma de Y tras una amnesia inducida por escopolamina se utilizan para ensayar el deterioro de la memoria y la posterior potenciación tras la administración de un inhibidor de ligando. En el laberinto de Morris, el diseño del experimento es esencialmente como se describió anteriormente, pero se modifica para que incluya un tratamiento de 30 minutos antes del entrenamiento en cada uno de los días 1 a 3 con una inyección intraperitoneal de hidrobromuro de escopolamina (0,3 mg/kg). Esta dosis amnésica de escopolamina deteriora la adquisición y la retención de paradigmas de aprendizaje espacial y de evitación en la rata. Se miden los efectos antiamnésicos de un inhibidor de ligando con relación a los grupos control concurrentes que reciben o no reciben escopolamina. La medida del efecto de los inhibidores de ligandos sobre la reversión de la amnesia inducida por escopolamina utilizando el laberinto en forma de Y se realiza de forma similar al ensayo del laberinto con forma de Y descrito anteriormente. La modificación de este ensayo incluye un tratamiento 30 minutos antes del entrenamiento en los días 5 a 10 con una inyección intraperitoneal de hidrobromuro de escopolamina (0,3 mg/kg). Los efectos antiamnésicos de un inhibidor de ligando administrado de modo central o sistémico se miden con relación al control concurrente y los grupos control tratados con escopolamina.

35 Se han diseñado varios ensayos para medir el comportamiento cognitivo en EA (véase Gershon *et al.*, Clinical Evaluation of Psychotropic Drugs: Principles and Guidelines, Prien y Robinson (eds.), Raven Press, Ltd., NY, 1994, p. 467). Uno de estos ensayos, el BCRS, mide la concentración, la memoria reciente, la memoria pasada, la orientación y el funcionamiento y el cuidado de sí mismo. El BCRS está diseñado para medir sólo las funciones cognitivas. Este ensayo, así como la escala de memoria Weschler y la escala asociada a la enfermedad de Alzheimer, puede utilizarse para determinar la mejora después de un tratamiento terapéutico con un inhibidor de ligando. Como se indicó anteriormente, una “mejora” en la enfermedad de Alzheimer está presente, dentro del contexto de la presente invención, si existe una diferencia estadísticamente significativa en la dirección de la normalidad en el ensayo de escala de memoria Weschler, por ejemplo, entre la actuación de pacientes tratados con inhibidores de ligandos comparados con los miembros de un grupo con placebo, o entre ensayos posteriores realizados con el mismo paciente. Además, la amnesia inducida por escopolamina en seres humanos puede emplearse como sistema modelo para ensayar la eficacia de los inhibidores de ligandos.

50 Los péptidos ligandos de CRFR1 de la invención también serán terapéuticamente útiles para modular el flujo sanguíneo en muchos y diversos lechos vasculares y, en particular, en los tejidos y los órganos deseados. Deberían poder utilizarse para aumentar el flujo sanguíneo hacia el tracto gastrointestinal de animales, en particular de seres humanos y otros mamíferos, puesto que se espera que dilaten el lecho vascular mesentérico. Se ha demostrado que el CRF modula la permeabilidad vascular (Wei E.T. *et al.*, “Peripheral anti-inflammatory actions of corticotropin-releasing factor”, pp. 258-276, Corticotropin-Releasing Factor (Ciba Foundation Symposium 172), John Wiley & Sons, 1993), y estos ligandos de CRFR1 también reducirán las pérdidas vasculares y tendrán un efecto saludable en la inflamación y el hinchamiento de tejidos inducidos por lesiones o por cirugía. Por tanto, estos ligandos de CRFR1 pueden administrarse por vía parenteral para disminuir la inflamación, el hinchamiento y el edema, y para reducir la pérdida de fluido tras una lesión térmica.

60 Se ha demostrado que el oCRF, el r/hCRF, la urotensina I y la sauvagina inhiben la producción de ácido gástrico, y se considera que es probable que los ligandos de CRFR1 de la invención también sean eficaces para el tratamiento de úlceras gástricas mediante la reducción de la producción de ácido gástrico y/o mediante la inhibición de ciertas funciones gastrointestinales en un mamífero.

65 Estos péptidos ligandos de CRFR1 también pueden utilizarse para evaluar la función hipotalámica-pituitaria-adrenal en mamífero sospechosos de presentar una patología endocrina o del sistema nervioso central, mediante la administración adecuada seguida del control de las funciones corporales. Por ejemplo, la administración puede utilizarse como herramienta de diagnóstico para evaluar la enfermedad de Cushing y los trastornos afectivos, tales como una enfermedad depresiva.

ES 2 322 133 T3

Los ligandos de CRFR1 o sus sales de adición no tóxicas normalmente se administrarán a mamíferos, incluyendo seres humanos, combinados con un vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. Tal como se emplean en la presente, las expresiones “farmacéuticamente aceptable”, “fisiológicamente tolerable” y sus variaciones gramaticales, cuando se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se utilizan de forma intercambiable. Preferiblemente, los materiales pueden administrarse a un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos indeseables, tales como náuseas, mareos, malestar gástrico y similares. Los péptidos deben ser al menos aproximadamente 90% puros y preferiblemente deben tener una pureza de al menos aproximadamente 97%. La administración a un paciente se realiza a una cantidad terapéuticamente eficaz, que es una cantidad calculada para lograr el efecto deseado, que puede ser aumentar el nivel de CRF libre en el cerebro, mejorar el aprendizaje y la memoria, disminuir la ingesta de alimento, activar los neurocircuitos del CRF en el cerebro, tratar enfermedades asociadas con bajos niveles de CRF en el cerebro, tratar los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer, tratar la obesidad, tratar la depresión atípica, tratar el síndrome de abstinencia de sustancias, tratar la depresión postparto o la pérdida de memoria relacionada con el envejecimiento. Para los expertos en la técnica será evidente que la vía de administración puede variar con el tratamiento concreto y también si se administra un inhibidor de ligando peptídico o no peptídico. Las vías de administración pueden ser invasivas o no invasivas. Las vías de administración no invasivas incluyen la vía oral, bucal/sublingual, rectal, nasal, tópica (incluyendo la vía transdérmica y oftálmica), vaginal, intravesical y pulmonar. Las vías de administración invasivas incluyen la vía ICV, intraarterial, intravenosa, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal e intraocular.

Las inyecciones intracerebroventriculares (ICV) se realizan en animales como sigue. Los animales se anestesian con halotano y se inmovilizan en un instrumento estereotáctico KOPF. Se implanta una cánula guía colocada por encima del ventrículo lateral y se ancla al cráneo con dos tornillos de acero inoxidable y cemento dental. Para las inyecciones, se inserta una cánula de acero inoxidable de calibre 30 unida a 60 cm de tubo PE 10 a través de la guía hasta 1 mm más allá de su extremo. Se inyectan dos microlitros del inhibidor de ligando mediante flujo por gravedad a lo largo de un periodo de un minuto simplemente alzando el tubo por encima de la cabeza del animal hasta que comience el flujo. Los procedimientos para las otras vías de administración son muy conocidos en la técnica.

La dosificación requerida variará con el trastorno concreto que se está tratando, con la gravedad del trastorno y con la duración del tratamiento deseado, y pueden utilizarse múltiples dosificaciones durante un solo día. Para la administración parenteral pueden emplearse disoluciones en aceite de cacahuete, en propilenglicol acuoso, o en una disolución acuosa estéril. Estas disoluciones acuosas, que se tamponan de forma adecuada, son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea (s.c.) e intraperitoneal. Pueden obtenerse con facilidad medios acuosos estériles y, para la administración s.c., puede preferirse aceite de maíz o una disolución de manitol al 3-6%. Estos péptidos a menudo se administran en formas de sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables, tales como sales de adición de ácidos o complejos metálicos. Pueden preferirse las sales del ácido trifluoroacético y del ácido pamoico.

Los péptidos deben administrarse siguiendo las instrucciones de un médico en una única dosis o en dosis múltiples, y las composiciones farmacéuticas normalmente contendrán el péptido junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable convencional. Estos vehículos son muy conocidos en la técnica y contienen, de forma típica, tampones y sales no tóxicas. Estos vehículos pueden comprender tampones, tales como disolución salina fisiológicamente tamponada, disolución salina tamponada con fosfato, carbohidratos como glucosa, manosa, sacarosa, manitol o dextranos, aminoácidos como glicina, antioxidantes, agentes quelantes como EDTA o glutatión, adyuvantes y conservantes. Las sales no tóxicas aceptables incluyen sales de adición de ácidos o complejos metálicos, por ejemplo con cinc, hierro, calcio, bario, magnesio, aluminio o similares (que se consideran sales de adición para los objetivos de esta solicitud). Los ejemplos de estas sales de adición de ácidos son las sales clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato, tannato, oxalato, fumarato, gluconato, alginato, maleato, acetato, citrato, benzoato, succinato, malato, ascorbato, tartrato y similares. Si el ingrediente activo se va a administrar en forma de comprimido, el comprimido puede contener un ligante, tal como tragacanto, almidón de maíz o gelatina; un agente disgregante, tal como ácido algínico; y un lubricante, tal como estearato de magnesio. Si se desea una administración en forma líquida pueden utilizarse edulcorantes y/o aromas, y puede realizarse la administración intravenosa en disolución salina isotónica, disoluciones de tampón fosfato o similares.

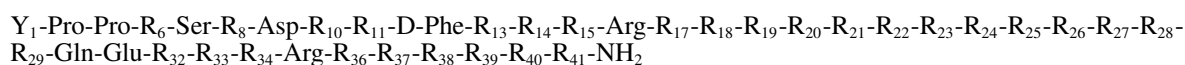
La dosificación eficaz depende, en general, de la vía de administración prevista y de otros factores, tales como la edad y el peso del paciente, como en general saben los médicos, y también de la enfermedad que se está tratando. Normalmente la dosificación será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 miligramos del péptido por kilogramo del peso corporal del animal hospedante diarios. Para el tratamiento de ciertas indicaciones pueden emplearse unas dosificaciones diarias de hasta aproximadamente 100 mg/kg. La dosificación diaria puede administrarse como una única dosis o hasta tres dosis divididas.

Como se mencionó anteriormente en la presente, ahora se han clonado los receptores de CRF y se realizan con facilidad ensayos de afinidad de unión y ensayos de unión que emplean receptores de CRF con péptidos identificados o sintetizados antes para determinar si estos péptidos serán unos ligandos de CRFR1 eficaces, según se describe en el documento WO 96/18649. Estos ensayos de receptores pueden utilizarse para seleccionar fármacos potenciales que interaccionan con CRF y/o con receptores de CRF.

Tal como se emplean en la presente, todas las temperaturas están en °C y todas las proporciones son en volumen. Los porcentajes de los materiales líquidos también se ofrecen en volumen.

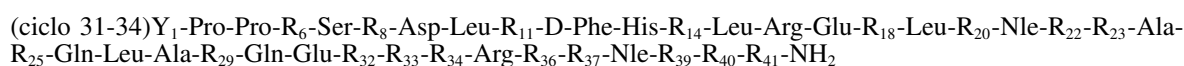
REIVINDICACIONES

1. Un péptido ligando de CRFR1 de 38 restos que se une a CRFR1 con una afinidad sustancialmente mayor que con la que se une a CRFR2, teniendo dicho péptido la siguiente fórmula, o su sal no tóxica:



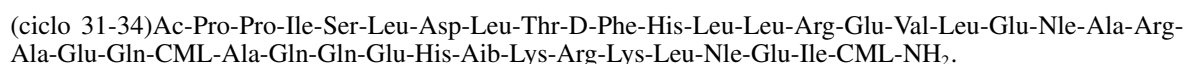
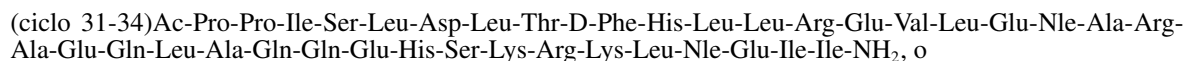
en la que Y₁ es un grupo acilo que no tiene más de 15 átomos de carbono o es tirosina radioyodada; R₆ es Ile, Met o Nle; R₈ es Leu o Ile; R₁₀ es Leu o CML; R₁₁ es Thr o Ser; R₁₃ es His, Tyr o Glu; R₁₄ es CML o Leu; R₁₅ es CML o Leu; R₁₇ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₈ es Val, CML, Nle o Met; R₁₉ es CML, Leu o Ile; R₂₀ es Glu, D-Glu o His; R₂₁ es Nle, Leu, CML o Met; R₂₂ es Ala, D-Ala, Aib, Thr, Asp o Glu; R₂₃ es Arg o Lys; R₂₄ es Ala, Gln, Ile, Asn, CML o Aib; R₂₅ es Asp o Glu; R₂₆ es Gln, Asn o Lys; R₂₇ es CML, Glu, Gln o Leu; R₂₈ es Ala, Lys, Arg o Aib; R₂₉ es Gln, Aib o Glu; R₃₂ es Aib o un L- o D-isómero de un α-aminoácido natural diferente de Cys; R₃₃ es Aib o un L- o D-isómero de Ser, Asn, Leu, Ala, CML o Ile; R₃₄ es Lys u Orn; R₃₆ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₃₇ es CML, Leu, Nle o Tyr; R₃₈ es Nle, Met, CML o Leu; R₃₉ es Glu, Aib o Asp; R₄₀ es Ile, Aib, CML, Thr, Glu, Ala, Val, Leu, Nle, Phe, Nva, Gly o Gln; y R₄₁ es Ala, Aib, Ile, CML, Gly, Val, Leu, Nle, Phe, Nva o Gln; con la condición de que puede existir un enlace ciclante entre Glu en la posición 31 y R₃₄, y con la condición además de que D-2Nal o D-Leu pueden reemplazar a D-Phe.

2. Un péptido según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:

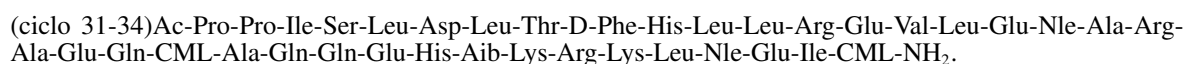
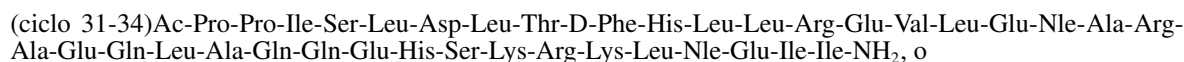


en la que Y₁ es un grupo acilo que no tiene más de 7 átomos de carbono; R₂₀ es Glu o D-Glu; R₂₂ es Ala o Thr; R₂₉ es Gln o Glu; R₃₂ es His, Aib, Ala, Gly, Leu, Gln o Glu; R₃₆ es Lys o Leu; R₃₇ es Leu o CML; R₃₉ es Glu o Asp; R₄₀ es Ile, CML o Glu; y R₄₁ es Ile, Aib o Ala; siendo el resto de las variables como se define en la reivindicación 1.

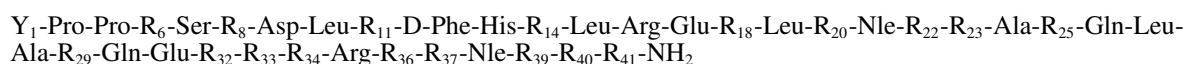
3. Un péptido según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



4. Un péptido según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



5. Un CRF según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:

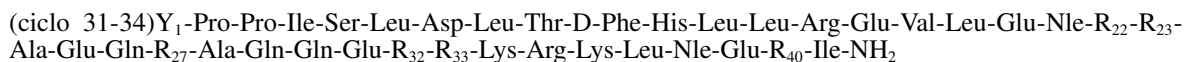


en la que Y₁ es un grupo acilo que no tiene más de 7 átomos de carbono; R₂₀ es Glu o D-Glu; R₂₂ es Ala o Thr; R₂₃ es Arg o Lys; R₂₉ es Gln o Glu; R₃₂ es His, D-His, Aib o Ala; R₃₆ es Lys o Leu; R₃₇ es Leu o CML; R₃₉ es Glu o Asp; R₄₀ es Ile, CML o Glu; y R₄₁ es Ile, Aib o Ala; siendo el resto de las variables como se define en la reivindicación 2, y en el que las cadenas laterales de Glu³¹ y R₃₄ pueden estar covalentemente conectadas.

6. Un péptido según la reivindicación 1, en el que R₁₈ es Val, R₂₂ es Ala, R₂₃ es Arg, R₂₄ es Ala, R₂₅ es Glu, R₂₈ es Ala, R₃₉ es Glu, y R₄₁ es Ile.

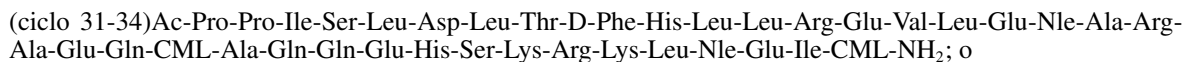
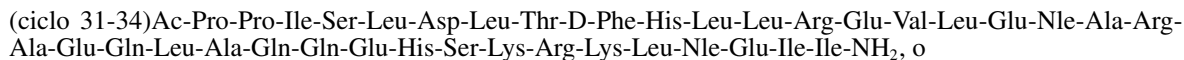
ES 2 322 133 T3

7. Un péptido según la reivindicación 1 que tiene la siguiente fórmula, o su sal no tóxica:



5 en la que R₂₂ es Ala o Thr; R₂₇ es Leu o CML; R₃₂ es His o Aib; R₃₃ es Ser o Aib; y R₄₀ es Ile o CML.

8. Un péptido según la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



20 9. Un péptido según la reivindicación 1 que es útil como marcador que se une de forma selectiva a CRFR1, en el que Y es D-Tyr o L-Tyr radiyodadas.

25 10. Un péptido ligando de CRFR1 de 38 restos que se une a CRFR1 con una afinidad sustancialmente mayor que con la que se une a CRFR2, teniendo dicho péptido la fórmula Y₁-Pro-Pro-A-D-Xaa-B-Glu-Xaa_a-Xaa_b-Xaa_c-C-NH₂, en la que Y₁ es un grupo acilo que no tiene más de 15 átomos de carbono o es tirosina radiyodada; A es una secuencia de 6 restos aminoácidos que se encuentra entre Pro en la posición 5 y Phe en la posición 12 de r/hCRF o la correspondiente secuencia de otro péptido de la familia del CRF; D-Xaa es D-Phe, D-2Nal o D-Leu; B es una secuencia de 18 restos aminoácidos que se encuentra entre Phe en la posición 12 y Ala en la posición 31 de r/hCRF o la correspondiente secuencia de otro péptido de la familia del CRF; Xaa_a es cualquier L- o D- α -aminoácido natural diferente de Cys o es Aib; Xaa_b es Aib o un L- o D-isómero de Ser, Asn, Leu, Ala, CML o Ile; Xaa_c es Lys u Orn, cuya cadena lateral puede estar unida en un enlace ciclante amida con la del Glu; y C es una secuencia de los últimos 7 restos aminoácidos de la porción C-terminal de cualquier péptido de la familia del CRF; con la condición de que Nle o Leu pueden estar reemplazados por Met en A, B y/o C.