

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 015**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 5/117 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2005 E 05786670 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 1794182**

54 Título: **Compuestos que modulan acciones de THR e inhiben la enzima de degradación de TRH**

30 Prioridad:

01.10.2004 IE 20040669

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.09.2015

73 Titular/es:

**THE PROVOST, FELLOWS AND SCHOLARS OF
THE COLLEGE OF THE HOLY AND UNDIVIDED
TRINITY OF QUEEN ELIZABETH NEAR DUBLIN
(100.0%)
Trinity College, Dublin University
Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

KELLY, JULIE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 546 015 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

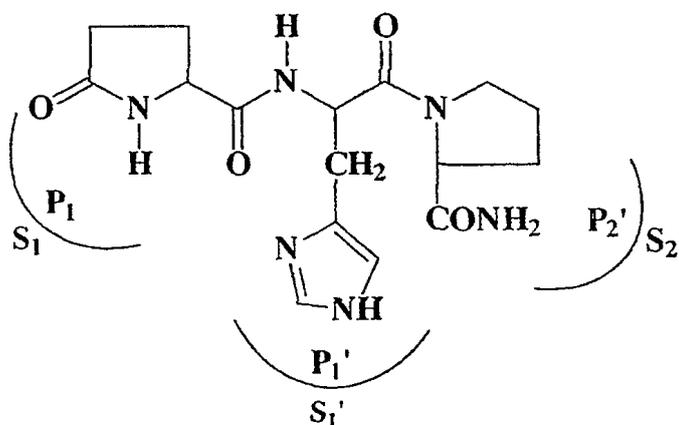
Compuestos que modulan acciones de THR e inhiben la enzima de degradación de TRH

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos y a los usos del mismo. En particular, se refiere a compuestos que inhiben a la ectoenzima degradante de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) (TRH-DE) (EC 3.4.19.6), también conocida como proglutamilo aminopeptidasa II (PAP-II, PP-II) y/o que potencian y/o imitan las acciones biológicas de la TRH. Como resultado, los compuestos de la presente invención encuentran una posible aplicación terapéutica en el campo de la medicina, particularmente, pero no limitado a, las afecciones que implican daños
10 celulares neuronales y alteraciones en la función neurobiológica. También tienen aplicación como herramientas para estudiar las funciones biológicas de la TRH, de la TRH-DE y de los receptores de la THR.

Antecedentes de la invención

La TRH tiene la estructura:



15 La nomenclatura de Schechter y Berger se usa para describir las posiciones de los restos del sustrato peptídico (P) con respecto al enlace escindible P₁-P₁' en los subconjuntos (S) correspondientes en el sitio activo de la enzima. En otras referencias bibliográficas, la porción derecha de la molécula se llama la porción "prolinaamida" o "C-terminal"; la porción central de la molécula se llama la porción "histidilo"; y la porción derecha de la molécula se llama la porción "proglutamilo" o "N-terminal".

20 La hormona liberadora de tirotropina (TRH) (proglutamilo-histidil-prolinaamida, Glp-His-ProNH₂) es un péptido neuroactivo de origen natural con múltiples acciones en el sistema nervioso central (SNC) que han mostrado ser beneficiosas en el tratamiento de trastornos del SNC, incluyendo daño cerebral y espinal, apoplejía, epilepsia y degeneración espinocerebral. Mientras que los mecanismos que subyacen a las acciones terapéuticas de la TRH no se entienden completamente, se reconoce por la técnica que la TRH tiene efectos beneficiosos sustanciales debido
25 en parte a su acción mitigando el daño celular neuronal secundario producido por una secuencia de reacciones bioquímicas desencadenadas por el daño primario. Se ha encontrado que esta misma secuencia de reacciones se dan tanto en la neurodegeneración aguda como crónica y los fármacos capaces de alterar esta secuencia tienen una aplicación posiblemente amplia como neuroprotectores. Se está volviendo evidente que aquellos componentes de dianas múltiples de la secuencia pueden ofrecer ventajas terapéuticas sobre las intervenciones farmacológicas marcadas como componentes únicos. Notablemente se ha mostrado que la TRH antagoniza las acciones de
30 múltiples constituyentes de la secuencia y también mejora las funciones bioquímicas críticas perjudicadas por traumatismos del SNC tales como la bioenergética celular. Las acciones neurotróficas de la TRH también pueden ser beneficiosas para restaurar la pérdida de función asociada a la neurodegeneración.

35 Las referencias bibliográficas recientes subrayan un reconocimiento creciente de la amplitud de las funciones de la TRH y la posible aplicabilidad clínica extendida de este péptido extraordinario. Por ejemplo, se ha reconocido recientemente que la TRH puede funcionar como un regulador homeostático central dentro de cuatro sistemas integrados del SCN y como tal puede tener una implicación y una aplicación terapéutica extensas en las enfermedades humanas asociadas a las alteraciones en la función neurobiológica, incluyendo afecciones tan diversas como descompensación horaria, obesidad y depresión. Otra investigación indica fuertemente un papel de la TRH en la fisiología y en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo y la epilepsia. En un artículo reciente
40 (Luo y col., 2002) se sugirió que la TRH podría funcionar como un neuroprotector endógeno y que los bajos niveles de la TRH encontrados en el hipocampo de los pacientes de Alzheimer podrían contribuir posiblemente a la patogenia de este trastorno. Con respecto a la epilepsia, la técnica muestra que la TRH es eficaz tratando pacientes con epilepsia intratable. Además, la técnica indica que el cerebro libera de forma natural la TRH en respuesta a convulsiones y que la TRH endógena tiene una función anticonvulsiva en el cerebro y juega un papel homeostático

reduciendo los efectos posiblemente dañinos de la epilepsia.

La técnica muestra que en las pruebas clínicas humanas la TRH tiene una gran ventana terapéutica y se tolera bien. La utilidad clínica de la TRH, sin embargo, se limita severamente por su susceptibilidad a la degradación enzimática, que reduce significativamente la biodisponibilidad de la TRH y la duración de la acción (Kelly, 1995). Esto se refleja en una realización decepcionante producida por la TRH nativa en pruebas clínicas. La corta vida media de la TRH, que surge de la degradación enzimática, también es un impedimento grave para la investigación adicional de las funciones de la TRH.

Como un medio de superar la susceptibilidad de la TRH al metabolismo la técnica, hasta la fecha, se ha concentrado ampliamente en el desarrollo de sistemas de liberación mejorados y análogos de la TRH estables a la degradación, que marcan a los receptores de la TRH y actúan como imitadores de la TRH. La patente de EE.UU. n° 5.244.884 se refiere a los análogos tionados de compuestos tipo TRH, que se unen selectivamente a los sitios de unión del receptor de la TRH en animales con alta afinidad y tienen ventajas farmacológicas posibles sobre la TRH tratando afecciones patológicas en las que se ha mostrado que los efectos de la TRH son beneficiosos. Las patentes de EE.UU. n° 5.112.804, n° 5.428.006, n° 5.693.608, n° 5.804.212, 6.491.939, n° 6.524.557 describen métodos para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sustancias biológicamente activas, incluyendo la TRH. La patente de EE.UU. n° 5.686.420 describe una serie de nuevos análogos de la TRH en los que el resto prolinaamida C-terminal se ha conservado, el resto N-terminal comprende una de las cinco estructuras de anillo diferentes y el resto histidilo se sustituye con CF_3 , NO_2 o un halógeno y el uso de estos análogos en el tratamiento de trastornos neurológicos. La solicitud de patente de EE.UU. n° 20020004062 describe métodos y composiciones para proporcionar la liberación prolongada de los agentes terapéuticos, incluyendo la TRH. La patente de EE.UU. n° 6.475.989 se refiere a péptidos con la fórmula general $Glp-X-ProNH_2$ y a su posible aplicación terapéutica. Hasta ahora, se ha aprobado un análogo estable a la degradación para uso terapéutico en humanos; éste se lanzó por Tanabe Seiyaku Co., Ltd., en 2000 para el tratamiento de la degeneración espinocerebral, un trastorno indicado de medicamento huérfano. En contraste con los análogos de la TRH descritos en la patente de EE.UU. n° 5.686.420 y la solicitud de patente de EE.UU. n° 20020004062, el resto prolinaamida C-terminal que se encuentra en la TRH y los péptidos similares a la TRH no se ha conservado en los compuestos descritos en la presente invención, descritos en el presente documento.

La técnica muestra que muchos análogos estables a la degradación que actúan como imitadores de la TRH contienen modificaciones en el resto proglutamilo N-terminal de la TRH (Kelly 1995, Horita 1998, Faden & Salzman 1992). Por ejemplo, el resto proglutamilo N-terminal de la TRH se ha reemplazado por un anillo de 6 miembros (por ejemplo TA-0910 es decir Ceredist, CG3509, CG3703), por un anillo de 5 miembros diferente (por ejemplo DN1417, JTP2942) y por un anillo de 4 miembros (por ejemplo YM14773). Tales análogos han mostrado por la técnica que imitan las acciones centrales de la TRH, a pesar de mostrar afinidad reducida por los receptores de la TRH.

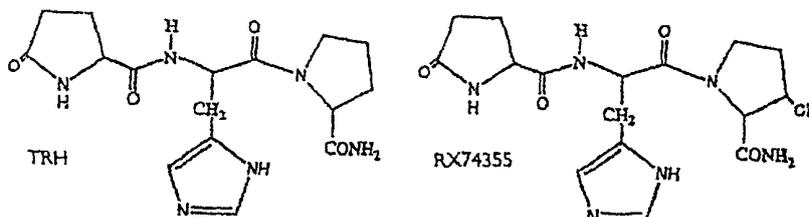
Kelly, J.A. y col., *Biochemical Journal* (2005) Vol. 389, 2. 569-576 informa de los efectos de las modificaciones estructurales en la proglutamilo-asparaginil-prolina-amida ($Glp-Asn-ProNH_2$) en la inhibición de la proglutamilo-peptidasa II (PPII). La extensión de la $Glp-Asn-ProNH_2$ con aminoácidos L-hidrófobos y el C-terminal se encontró que mejoraba sustancialmente la potencia de los inhibidores de la PPII. Tal extensión del C-terminal de la $Glp-Asn-ProNH_2$ da lugar a un conjunto de inhibidores de la PPII que son activos *in vitro* en concentraciones nanomolares.

Wilks, S. y col., *Neurochemistry International* (1989) Vol. 15, 1. 81 - 89 desvela el compuesto $Glp-His-Pro-Ala-NA$ (donde NA representa 2-naftilamida) que se une a, pero no se hidroliza por la ectoenzima degradante de la hormona liberadora de tirotropina (TRH-DE) y tiene una K_i de 95 micromolar. Todos estos compuestos contienen L-aminoácidos.

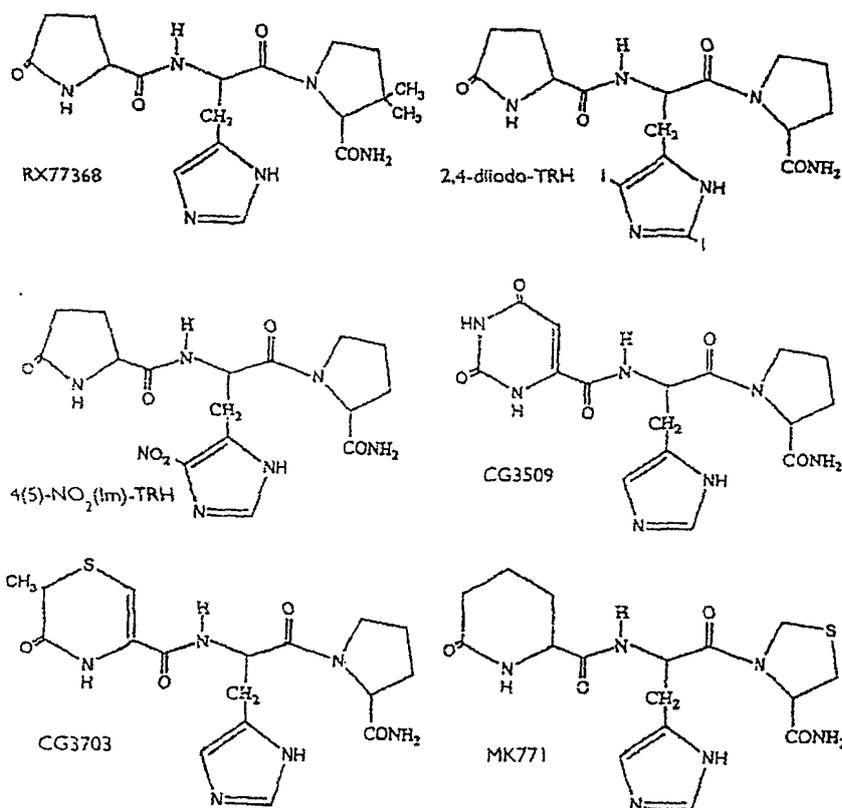
Metcalf, G., *Chemical Abstracts* (1983) 315-326, Thyrotropin-releasing Horm. Desvela el compuesto tetrapeptídico $Glp-His-Pro-Ala-NH_2$ en el que se muestra que la estereoquímica absoluta es toda L. $Glp-His-Pro-Ala-NH_2$ se encontró que tiene actividades endocrinas que eran menores que o no mayores que la TRH.

La Publicación Internacional n° WO 01/60843^a describe derivados peptídicos que comprenden L-aminoácidos que son útiles como inhibidores de la actividad de la ectoenzima degradante de la hormona liberadora de tirotropina (TRH-DE) y pueden usarse en métodos para tratar el SNC u otros trastornos dependientes de la TRH.

Los siguientes son una selección de análogos de la TRH conocidos:-



50



5 Una aproximación alternativa para facilitar el uso clínico de la TRH es protegerla de la degradación inhibiendo su degradación enzimática. La ectoenzima degradante de la TRH (TRH-DE) (EC 3.4.19.6), también conocida como proglutamilo aminopeptidasa II (PAP-II, PP-II) se reconoce por la técnica que es la enzima responsable de degradar la TRH extracelular. De esta manera, la TRH-DE es una diana terapéutica atractiva debido al potencial ofrecido por los inhibidores de la TRH-DE para mejorar los efectos terapéuticos de la TRH. La TRH-DE cataliza la retirada del grupo proglutamilo N-terminal de la TRH y se localiza en la superficie de las células neuronales. Una forma soluble de la enzima, conocida como tiroliberinasa, está presente en el suero. La TRH-DE parece ser un raro ejemplo de 10 una peptidasa específica de neuropéptidos ya que muestra una especificidad funcional absoluta para la TRH. Adicionalmente, la TRH no se degrada por ninguna otra enzima que esté en una posición para afectar a la señalización de la TRH. Por lo tanto, la modulación de la actividad de la TRH-DE debería, en principio, amplificar exclusivamente los efectos de la THR. La relación especial entre la TRH-DE y la TRH debería asegurar que solamente las acciones biológicas de la TRH se amplifican y, de esta manera, dan lugar a mínimos efectos secundarios. 15

Hasta la fecha, no hay estructura cristalina o modelo de homología para la TRH-DE en la que basar el diseño racional de los inhibidores dirigidos al sitio activo. Sin embargo, a través de la investigación llevada a cabo por el inventor nombrado en el presente documento, se han identificado inhibidores competitivos potentes de la TRH-DE 20 (Kelly y col. 2000a, 2000b, Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944). Antes de esto, se han informado pocos inhibidores de la TRH-DE - el más potentes de estos fue la N-[1-carboxi-2-feniletil]N-imidazol bencil histidil-β-naftilamida (K_i de 8 mM) (Charli y col., 1989). Un artículo reciente por Pascual y col., (2004) ha descrito el aislamiento de una actividad inhibidora de la TRH-DE a partir de un invertebrado marino. Sin embargo, el tipo de inhibición no se ha definido, su estructura molecular todavía no se conoce, ni si es cierto que la inhibición se deba a una única entidad química. 25

La técnica indica que las acciones de los péptidos, tales como la TRH, se median por receptores específicos. Se han descrito dos subtipos del receptor de la TRH hasta ahora: receptor 1 de la TRH (TRHR1) y receptor 2 de la THR (TRHR2). Estos receptores tienen distintas secuencias de aminoácidos y patrones de distribución, pero ambos muestran una alta afinidad similar para la [³H][3-Me-His²]THR. El TRHR1 se conserva altamente entre especies, incluyendo los humanos. A diferencia del TRHR1, el TRHR2 no se ha identificado en humanos. En las ratas la expresión del TRHR2 está restringida al SNC. Esto contrasta con el TRHR1, que muestra una expresión de ARNm muy limitada en el SNC. Se ha encontrado que la distribución regional del ARNm del TRHR2 es coherente con la posibilidad de que este receptor de la TRH esté implicado en la mediación de las funciones cognitivas superiores de la TRH, así como sus efectos en la excitación, la actividad locomotora y la percepción del dolor. La distribución del TRHR1 por otro lado indica que este receptor está involucrado en la mediación de las funciones endocrinas de la THR. Se ha mostrado por la técnica que el reemplazamiento o la modificación del resto histidilo central de la TRH reduce severamente la afinidad del receptor (Gershengorn y Osman, 1996). Solamente se ha identificado una 30 35

excepción que se une con mayor afinidad que la TRH a los receptores de la TRH y esa es [3-Me-His²]TRH. Se ha encontrado que todos los análogos estables a la degradación descritos en las Patentes de EE.UU. n° 4.906.614, n° 5.244.884 y n° 5.686.420 se unen a los sitios del receptor de la TRH dentro del cerebro, excitando con menos potencia que la TRH. La técnica indica que las preferencias estructurales para la unión del ligando a los receptores de la TRH y la TRH-DE son diferentes (Kelly y col., 2002). Por ejemplo, tanto Glp-Asn-ProAMC como Glp-Asn-ProNH₂ han mostrado ser potentes inhibidores de la TRH-DE, pero muestran baja afinidad en comparación con la TRH para los receptores marcados [³H][3-Me-His²]TRH en membranas corticales de rata.

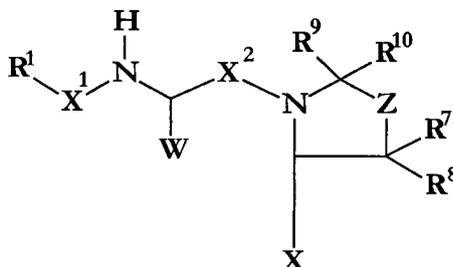
La presente invención describe compuestos nuevos que inhiben potentemente la TRH-DE y o se unen a los receptores de la TRH con alta afinidad y potencian sustancialmente las acciones de la TRH en ratas. Los inhibidores de la TRH-DE potentes que también se unen a los receptores de la TRH y que amplifican los efectos de la TRH no se habían descrito previamente y son los primeros de su clase. Estos compuestos son distintos de aquellos descritos en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944 debido a que inhiben la TRH-DE y o se unen a receptor o receptores de la TRH. Además, a diferencia de los compuestos desvelados en el presente documento, los aminoácidos contenidos dentro de la estructura de los inhibidores de la TRH-DE descritos en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944 están todos en la configuración L. Ciertos compuestos de la presente invención también son diferentes de otros compuestos que han mostrado unirse a los receptores de la TRH, con la excepción de 3-Me-His²TRH, en que muestran mayor afinidad por los receptores de la TRH que la TRH. 3-Me-His²TRH es el único compuesto que también se une a los receptores de la TRH con mayor afinidad que la TRH.

Objeto de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar inhibidores adicionales de la TRH-DE. Otro objeto de la presente invención es proporcionar moléculas que imiten las acciones de la TRH que a su vez darían lugar a un intervalo de productos farmacéuticos para usar en nuevos métodos de diagnóstico, prevención, retraso del avance y tratamiento de los trastornos en los que los efectos de la TRH serían terapéuticamente útiles, en particular, la lesión, el daño o el malfuncionamiento del SNC. Es un objeto particular proporcionar moléculas, que se unan a los receptores de la TRH con una alta afinidad, particularmente una mayor afinidad que la TRH por sí misma.

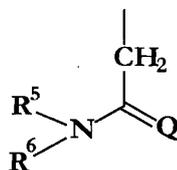
Sumario de la invención

En un aspecto la presente invención proporciona compuestos de la Fórmula I:



en la que

R¹ es un anillo heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros, teniendo el anillo uno o más heteroátomos que se seleccionan de O, S o N; en el que el anillo heterocíclico se sustituye opcionalmente con un oxo, tioxo; alquilo C₁-C₅; alqueno C₁-C₅; alquino C₁-C₅; alcoxi C₁-C₅; arilo; halo; halo alquilo C₁-C₅; nitro; azido; ciano; hidroxilo; hidroxil alquilo C₁-C₅; un SO_nR¹⁴ donde R¹⁴ es alquilo y n = 0, 1 o 2; o un grupo carbonilo o éster de la fórmula -COOR¹⁵ donde R¹⁵ es H o alquilo C₁-C₅ y que puede estar en la forma iónica COO⁻; y en la que X¹ es -CO-, -CS-, -CH₂CO- o CH(R⁴), en la que R⁴ es H o alquilo opcionalmente sustituido, o -COOH o -COOR¹¹, en la que R¹¹ es alquilo C₁-C₅ opcionalmente sustituido; X² es -CO- o -CS-; Z es -CH₂-, -S-, -O- o -NH-; R⁷ y R⁸ (que pueden ser la misma o diferente), son H o alquilo C₁-C₅ opcionalmente sustituido; R⁹ y R¹⁰ (que pueden ser la misma o diferente), son H, alquilo C₁-C₅ opcionalmente sustituido o un anillo carbocíclico opcionalmente sustituido; en la que los grupos alquilo C₁-C₅ opcionalmente sustituidos son halo, nitro o ciano; W representa una cadena lateral de un resto de aminoácido, natural o no natural; en la que la cadena lateral es



en la que Q es O o S; y

R⁵ y R⁶ (que pueden ser la misma o diferente), son H o alquilo C₁-C₅; o W representa la cadena lateral de un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, histidina, leucina, tienilalanina y fenilalanina;

5 X representa de 1 a 20 aminoácidos, seleccionados del grupo que consiste en fenilalanina, triptófano y tirosina que están en la configuración D, el aminoácido C-terminal del resto X estando opcionalmente sustituido con un grupo amino o con 7-amino-4-metil cumarina.

; >> y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos preferidos son aquellos en los que X representa de 1 a 10 aminoácidos y los particularmente preferidos son aquellos en los que X representa de 1 a 3 aminoácidos.

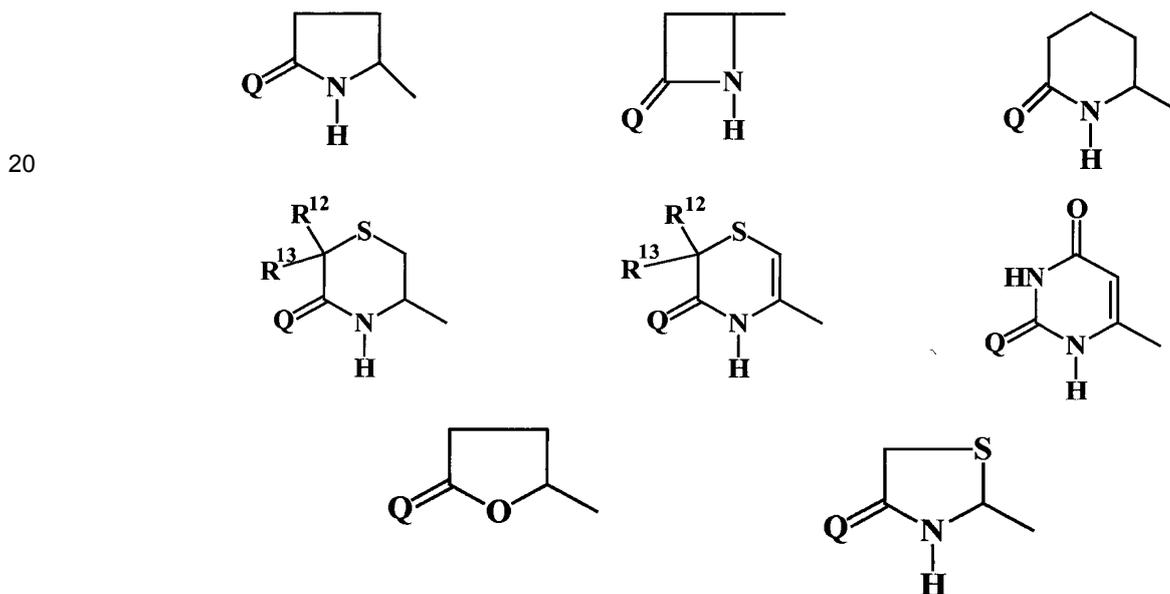
10 Los aminoácidos son compuestos que tienen la estructura RCHNH₂COOH. Los aminoácidos pueden categorizarse como neutros, ácidos o básicos dependiendo de la naturaleza de su grupo R específico (McMurray). Los aminoácidos pueden ser de origen natural o de origen no natural (es decir no naturales).

En realizaciones preferidas R⁵ y R⁶ son H.

15 En realizaciones particulares R⁵ y R⁶ son H y Q es O, de tal manera que los compuestos tengan el resto asparagina (Asn) en la posición P₁¹. El resto Asn puede estar en la configuración L o en la configuración D. Donde Asn está en la configuración D la molécula no inhibe la ectoenzima degradante de la TRH.

W puede representar restos de aminoácidos en los que el grupo R está cargado o es neutro. W puede seleccionarse del grupo que consiste en asparagina, histidina, leucina, tienilalanina y fenilalanina.

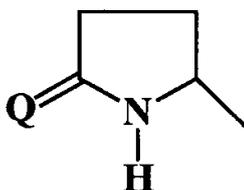
R¹ puede ser adecuadamente:



25 en las que R¹² es hidrógeno, alquilo C₁-C₅ o fenilo,
R¹³ es hidrógeno o alquilo C₁-C₅,
Q es O o S.

En realizaciones preferidas, Q es O. Más adecuadamente R¹ es un anillo heterocíclico de cinco miembros, particularmente un anillo de pirrolidinona, de tiazolidinona o de butirolactona.

En realizaciones preferidas particulares, R¹ es



30 En otro aspecto la presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura:-

Glp-W¹-Pro-X

en la que W¹ representa un resto de aminoácido con las cadenas laterales como se define anteriormente, natural o no natural; y

5 X representa restos de 1 a 20 aminoácidos que se seleccionan independientemente de fenilalanina, tirosina y triptófano, que están en la configuración D, el resto aminoacídico C-terminal de X está opcionalmente sustituido con un grupo amino o aminometilcumarina; y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Los compuestos preferidos son aquellos en los que X puede representar de 1 a 10 aminoácidos y los particularmente preferidos son aquellos en los que X representa de 1 a 3 aminoácidos. Preferentemente todos los aminoácidos de X están en la configuración D.

10 W puede seleccionarse del grupo que consiste en asparagina, histidina, leucina, tienilalanina y fenilalanina.

Donde Asn está en la configuración D la molécula no inhibe la ectoenzima degradante de la TRH.

Los compuestos particularmente preferidos de acuerdo con la presente invención son

15 Glp-Asn-Pro-D-TyrNH₂,
Glp-Asn-Pro-D-TrpNH₂,
Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂,
Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-Trp-D-TrpNH₂
20 Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpAMC,
Glp-Asn-Pro-D-Trp-D-TyrAMC,
Glp-Asn-Pro-D-TrpAMC,
Glp-His-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂,

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

25 Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden tener sustituyentes presentes que no interfieran sustancialmente con la función de los compuestos como inhibidores de la actividad de la ectoenzima degradante de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH-DE) o en la unión a los receptores de la TRH y actuando como imitadores de la TRH. Los sustituyentes pueden ser grupos hidrocarburos acíclicos ramificados o sin ramificar saturados o insaturados tales como los grupos alquilo, alcoxi, alquilenos, alqueno o alquinilo, o grupos hidrocarburos saturados o insaturados mono- o policíclicos que tienen opcionalmente heteroátomos en la estructura del anillo y un anillo opcionalmente fusionado.

30 Adecuadamente puede haber de 1-3 heteroátomos por anillo y los heteroátomos en cualquier anillo pueden ser los mismos o diferentes.

Un grupo de compuestos preferidos tienen un grupo amida N-sustituido en el C-terminal de la molécula.

35 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto como se define anteriormente y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo para usar en un método para la prevención, el retraso del avance o el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia o un método diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal.

40 La presente invención también proporciona los compuestos como se definen anteriormente y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para usar *in vitro* o para usar como un medicamento para potenciar o mejorar la TRH endógena y/o para proteger la TRH o los análogos de la TRH administrados exógenamente de la degradación por la TRH-DE o actuando como un imitador de la TRH.

En otro aspecto la presente invención también proporciona agentes con actividad dual como los agentes de unión al receptor de la TRH y los inhibidores de la TRH-DE que comprenden los compuestos como se define anteriormente.

45 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto como se define anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender adicionalmente TRH o un análogo de la TRH.

50 En otra realización los compuestos de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes farmacológicamente activos para aumentar la eficiencia terapéutica, tales como TRH exógena o análogo o análogos de la TRH y o agentes que supriman dianas adicionales, por ejemplo, prolilo oligopeptidasa.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en combinación con una o más otras sustancias farmacológicamente activas.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por rutas de administración oral, parenteral, inyección intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.), nasal, vaginal, rectal o sublingual y puede formularse en formas de dosificación apropiadas para cada ruta de administración.

5 Por cantidad farmacéuticamente eficaz se entiende una cantidad del compuesto suficiente para inhibir la TRH-DE o para actuar como un imitador de la TRH. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son aquellos que pueden administrarse junto con los compuestos de la presente invención sin producir efectos biológicos deletéreos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados se conocen por los expertos en la materia.

10 La presente invención puede aplicarse entre otros en el desarrollo de los terapéuticos para cualquier trastorno relacionado con la TRH, entre otros, lesión cerebral y espinal o tumor, pérdida de memoria, degeneración espinocerebral, dolor incluyendo dolor de la médula espinal, epilepsia, trastornos de la alimentación, trastornos del control de peso (particularmente obesidad), diabetes y enfermedades relacionadas con el SNC, así como pérdida de memoria, letargo, trastornos de la ansiedad, descompensación horaria, trastornos de déficit de atención, síndrome post-traumático y como un estabilizante o potenciador del ánimo, para potenciar el desarrollo fetal apropiado y como una herramienta de investigación para investigar los procesos celulares relacionados con la TRH y la TRH-DE y el receptor de la TRH.

Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1. Liberación de la TRH de rebanadas hipotalámicas de cerebro de rata en condiciones basales y de despolarización en presencia y ausencia de un inhibidor de la TRH-DE: (a) Glp-Asn-Pro-AMC (0,1 mM en solución salina) o (b) Glp-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-AMC (0,1 mM en DMSO) y (c) Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂ (JAK 4D) (0,1 mM en DMSO). Los datos son medias \pm desviación estándar de n = 6. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 frente al basal correspondiente; #p<0,05 ###p<0,001 frente al trastorno correspondiente en ausencia de inhibidor (ensayo de la t de Student de dos colas desapareado).

25 Figura 2. Desplazamiento de [³H][3-Me-His²]THR por (A) JAK1-D y JAK1-L, (B) JAK2-D y JAK2-L y (C) JAK4-D y JAK4-L. Los datos son medias \pm desviación estándar, n=3-5.

Figura 3. Efecto de la TRH en valores de actividad en ratas. La TRH se administró en t=25 min. Los puntos son medias \pm desviación estándar, n=5-21.

30 Figura 4. Efecto de JAK4-D en la actividad espontánea de las ratas. JAK4-D se administró en t=10 min. Los puntos son medias \pm desviación estándar, n=5-21.

35 Figura 5. Comparación de los efectos de 1 mg/kg de JAK4-D y 5 mg/kg de TRH en la actividad espontánea de las ratas. JAK4-D se administró en t=10 min; TRH se administró en t=25 min. Los puntos son medias \pm desviación estándar, n=5-21.

Figura 6. Efecto de JAK4-D en la estimulación de la actividad de las ratas por 10 mg/kg de TRH. JAK4-D se administró en t=10 min; TRH se administró en t=25 min. Los puntos son medias \pm desviación estándar, n=5-21.

40 Figura 7. Estimulación de agitaciones de perro mojado (APM) por la TRH. La TRH se administró en t=25 min. Los puntos son medias \pm desviación estándar, n=6.

45 Figura 8. Efecto de JAK4-D en el comportamiento de agitación de perro mojado (APM) en ratas. JAK4-D se administró en t=10 min. Los puntos son medias \pm desviación estándar, n=4-6.

Figura 9. Efecto de JAK4-D en agitaciones de perro mojado (APM) inducidas por TRH. JAK4-D se administró en t=10 min; TRH se administró en t=25 min. Los puntos son medias \pm desviación estándar, n=4-6.

Descripción de la Invención

50 La presente invención se refiere a compuestos que pertenecen a la serie de compuestos descritos a continuación que inhiben a la TRH-DE y o tienen una alta afinidad de unión por el receptor o receptores de la TRH y actúan para potenciar o imitar las acciones de la TRH.

55 Estos compuestos son distintos de aquellos descritos en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944, ya que inhiben la TRH-DE y/o se unen a los receptores de la TRH. Los inhibidores potentes de la TRH-DE que también se unen a los receptores de la TRH y que amplifican los efectos centrales de la TRH son nuevos y los primeros de su clase. Los agentes bi-funcionales, que ejercen acciones duales, pueden tener la posibilidad de producir mayores beneficios terapéuticos. Ciertos de estos compuestos son diferentes de otros compuestos, con la excepción de la 3-Me-His²THR, que se han informado en la técnica que se unen a los receptores de la TRH, en que se unen a los receptores de la TRH con mayor afinidad que la TRH. Estos compuestos no se han informado que se den de forma natural.

60

Se estudió la capacidad de unión ofrecida por la intermediación del sitio de unión S2' de la TRH-DE. Los estudios previos habían demostrado que el remplazamiento del grupo NH₂ C-terminal de Glp-Asn-ProNH₂ por AMC da como resultado una potenciación mayor de diez veces de la afinidad de unión a la TRH-DE. Además la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) se une a la TRH-DE con afinidad ligeramente mayor que la TRH (O'Cuinn y col., 1990). La TRH y la LHRH comparten la misma secuencia de dipéptido N-terminal, pero la LHRH es un decapeptido con la estructura primaria Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂ y no se hidroliza por la TRH-DE (O'Cuinn y col., 1990). Los estudios de actividad de la estructura cuantitativos realizados para una serie de análogos C-terminalmente extendidos de Glp-Asn-ProNH₂ por medio de ensayos cinéticos, usando TRH-DE purificada de cerebro porcino como se describe previamente (Kelly y col. 2000a, 2000b, Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944), revelaron que la extensión C-terminal de Glp-Asn-ProNH₂ con L-aminoácidos hidrófobos dio como resultado un conjunto de inhibidores de la TRH-DE con potencia nM (Tabla I). Los L-aminoácidos en estos péptidos se reemplazaron con D-aminoácidos. La vasta mayoría de polipéptidos de origen natural se componen de L-aminoácidos y las enzimas proteolíticas de mamíferos se diseñan para trabajar con esta estereoquímica. De esta manera, el remplazamiento de los L-aminoácidos por D-aminoácidos se usa en la técnica en un intento de conferir estabilidad a la degradación proteolítica como se describe en la Patente de EE.UU. n° 6.703.366. Se reconoce por la técnica que este tipo de remplazamiento, sin embargo, puede llevar a la pérdida de la especificidad y o la actividad del péptido como se observa por la Patente de EE.UU. n° 4.587.233, Sato y Col. 1987 y Fischer 2003, y de esta manera el efecto del remplazamiento es impredecible. No obstante, hay ejemplos en la técnica donde tales remplazamientos han llevado a compuestos con propiedades biológicas superiores (Leng y Col., 1996, Magdolen y Col. 2001). El remplazamiento de los L-aminoácidos por D-aminoácidos también se ha usado en la técnica para estabilizar las configuraciones bioactivas - por ejemplo se sabe por los expertos en la materia que la introducción de D-Pro-Xaa en una secuencia de polipéptido puede estabilizarse como una horquilla β (Karle y Col., 2003). El remplazamiento de los L-aminoácidos por D-aminoácidos también puede usarse para escanear la importancia relativa de la estereoquímica de grupos funcionales particulares en una estructura peptídica y también aquella de las estructuras locales dentro del péptido (Hruby, 2002). En relación con la presente invención se ha encontrado que la Glp-D-Asn-L-prolinaamida no es un inhibidor eficaz de la TRH-DE ($K_i > 1000$ mM). Además, se encontró que los valores de K_i para Glp-L-Asn-L-prolinaamida y Glp-L-Asn-D-prolinaamida eran 17,5 mM y 31,2 mM, respectivamente, indicando que la enzima es tolerante al remplazamiento de L-prolinaamida con D-prolinaamida. En los ejemplos presentados en el presente documento se desvela que no se encontró que el remplazamiento de los L-aminoácidos en la extensión C-terminal de Glp-Asn-ProNH₂ por D-aminoácidos provocara ningún cambio significativo en la afinidad por la enzima.

Inesperadamente, se encontró que los análogos extendidos C-terminalmente de Glp-Asn-ProNH₂ que contienen D-aminoácidos en la extensión C-terminal se unían a los receptores de la TRH receptores marcados con [³H]-3MeHis-TRH en la corteza cerebral de rata con gran afinidad. La investigación muestra que la [³H][3MeHis²]TRH se une a una población única de sitios de alta afinidad en las membranas corticales cerebrales de rata con una K_d de alrededor de 5 nM (Sharif 1989, Kelly y Col., 2002). Ya que los estudios de hibridación *in situ* han revelado que la corteza cerebral de ratas expresa predominantemente el TRHR2 puede especularse que los sitios marcados por la [³H][3MeHis²]TRH en las membranas corticales cerebrales de rata corresponden al TRHR2. No se puede descartar, sin embargo, que la [³H][3MeHis²]TRH se esté uniendo a un subtipo de receptor de la TRH en la corteza cerebral de rata que todavía ha de identificarse.

No es obvio por qué estos compuestos se unen tanto a la TRH-DE como a los receptores corticales de la TRH y este fenómeno no podía haberse predicho. Los estudios previos han mostrado que las preferencias estructurales para la unión a los receptores de la TRH y a la TRH-DE son diferentes (Kelly y Col., 2002). Por ejemplo, tanto Glp-Asn-ProAMD como Glp-Asn-ProNH₂ son potentes inhibidores de la TRH-DE, pero muestran una afinidad relativamente baja en comparación con la TRH para los receptores marcados [³H]-3MeHis-TRH en las membranas corticales de rata. Además, también se ha encontrado que Glp-L-Asn-L-Pro-L-Tyr-L-Trp-L-TrpAMC y Glp-L-Asn-L-Pro-Tyr-L-Trp-AMC muestran baja afinidad por los receptores marcados [³H]-3MeHis-TRH en la corteza cerebral de rata. De esta manera, extendiendo la estructura de Glp-Asn-ProNH₂ en el C-terminal con D-aminoácidos, el presente inventor ha alterado significativa e impredeciblemente las propiedades de los inhibidores de la TRH-DE, desvelado en Kelly y Col., 2000a, 2000b y Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944.

Con la excepción de 3MeHis²-TRH, ciertos compuestos descritos en la presente invención son los únicos compuestos que se sabe que se unen al receptor o receptores de la TRH con mayor afinidad que la TRH. La técnica indica que las cadenas laterales de los tres aminoácidos en la TRH están implicados en la unión al receptor de la TRH (Gershengorn y Osman, 1996). Además, solamente se ha encontrado un análogo entre cientos estudiados que muestra mayor afinidad por los receptores de la TRH que la TRH; ese análogo es 3MeHis-TRH. Todos los análogos peptídicos que se ha encontrado que se unen a los receptores de la TRH son agonistas. Hasta la fecha, no se habían identificado agonistas parciales o antagonistas de alta afinidad de los receptores de la TRH. Se han llevado a cabo estudios extensivos de mutagénesis dirigida al sitio y modelado computacional con respecto a los receptores de la TRH, pero no hay nada en sus enseñanzas que indique la línea de investigación que lleva a la presente invención de los compuestos que se unen a los receptores de la TRH con mayor afinidad que lo hace la TRH.

Los compuestos descritos en la presente invención pueden administrarse por rutas de administración oral, parenteral, inyección intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c.), nasal, vaginal,

rectal o sublingual y puede formularse en formas de dosificación apropiadas para cada ruta de administración. Las formas de dosificación adecuadas se conocen por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n° 4.906.614 Giertz y Col. O en la Patente de EE.UU. n° 5.244.884 Spatola y Col. Los niveles de dosificación deberían ser suficientes para conseguir la inhibición de la TRH-DE y los efectos imitadores de la TRH requeridos para el tratamiento de la afección física que se aborda.

Deseablemente, la presente invención proporcionará el uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento, particularmente para el tratamiento de lesiones cerebrales o espinales u otros trastornos del sistema nervioso central u otros trastornos dependientes de la TRH.

Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse solos o junto con sustancias farmacológicamente activas adicionales para aumentar la eficiencia terapéutica tales como TRH exógena o análogos de la TRH y o agentes dirigidos a dianas adicionales, por ejemplo, prolilo oligopeptidasa.

Deseablemente la presente invención proporcionará un método para tratar lesiones cerebrales o espinales u otros trastornos del sistema nervioso central u otros trastornos dependientes de la TRH, que comprende administrar a un paciente que padece tales lesiones o trastornos una cantidad de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo eficaz para potenciar o mejorar la TRH endógena y/o para proteger a la TRH administrada exógenamente o a los análogos de la TRH de la degradación por la TRH-DE y o para unirse a los receptores de la TRH e imitar las acciones de la TRH.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que contienen una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente del mismo. Normalmente la composición también comprenderá un vehículo farmacéuticamente aceptable, particularmente un vehículo inerte.

El término "tratar" como se usa en el presente documento se entiende que abarca curar así como mejorar al menos un síntoma de la afección o la enfermedad. De esta manera la prevención, el retraso del avance de una afección o una enfermedad y la atención posterior se incluyen todos en la definición. De forma análoga, un "terapéutico" es un agente que cura o mejora o previene al menos un síntoma de la afección o la enfermedad. La presente invención puede aplicarse en aproximaciones de terapia para trastornos biológicamente importantes que afectan a ciertos tipos celulares o subpoblaciones celulares. De manera similar la aproximación puede usarse para modular procesos biológicos normales y o disfuncionales. La presente invención puede usarse también en la investigación de los mecanismos biológicos y de los procesos celulares relacionados con la TRH-DE diana y los sustratos de la diana, y o relacionados con el receptor o receptores de la TRH diana y los ligandos de los mismos, por ejemplo, la TRH.

Ejemplos

Los ejemplos presentados ilustran que los compuestos de la presente invención inhiben posiblemente la TRH-DE y o se unen a los receptores de la TRH con alta afinidad y provocan y o sustancialmente potencian las acciones de la TRH en ratas.

Procedimientos generales para sintetizar los compuestos de la presente invención:

Todos los reactivos fueron de grado analítico y se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Company (Irlanda) salvo que se indique lo contrario. Los péptidos pueden producirse usando métodos familiares para los expertos en la materia. Los péptidos se sintetizaron usando métodos de solución y/o de fase sólida (Walker, 1994) y se purificaron, se analizaron y se juzgó que fueran homogéneos por HPLC (Kelly y Col. 1997, 1999, 2000a, Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944). Los análisis de HPLC se llevaron a cabo usando una HPLC Thermo Separation Products Inc. Spectra System.

Se empleó química Fmoc en fase sólida convencional usando el sistema de burbujeo en gas nitrógeno (Walker, 1994). Se usó la resina MBHA de amida de Rink para la síntesis de las secuencias de péptido amida, tales como Glp-Asn-ProNH₂, Glp-Asn-ProDTyr-DTrpNH₂ y Glp-His-ProDTyr-DTrpNH₂. Las resinas, los derivados de aminoácidos Fmoc y el ácido proglutámico se obtuvieron de Novabiochem (Merck Biosciences Ltd, R.U.). La síntesis de las amidas de péptidos se llevó a cabo usando una resina MBHA de amida de Rink (capacidad de carga: 0,73 mmol g⁻¹). Esto se hinchó usando *N,N*-dimetil-formamida (DMF) y se desprotegió con piperidina al 20 % en DMF durante 30 minutos. Cada aminoácido (3 equivalentes (eq.), es decir un exceso de 3 veces sobre la capacidad de carga de la resina) se acopló a la resina con HBTU/HOBt/DIPEA (3:3:6 eq.) durante 1 h. La desprotección de Fmoc se logró con piperidina al 20 % en DMF. Al terminar el ensamble del péptido, la resina se lavó con diclorometano (DCM) seguido de metanol y se dejó secar durante toda la noche. La secuencia se rompió de la resina y se desprotegió agitando la resina seca en una solución de TFA (95 %) que contiene agua (2,5 %) y triisopropilsilano (2,5 %) (10 ml/g de residuo seco) (v/v/v) a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró al vacío y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se lavó con éter de petróleo y se precipitó con éter de dietilo. Los productos obtenidos siguiendo el tratamiento con éter de dietilo se purificaron usando una columna de HPLC en fase reversa C-18 semi-preparativa (μ BondaPak, Waters, EE.UU.) y un gradiente lineal de B 0-70 % a una velocidad de caudal de 2,5 ml/min (disolvente A = ácido trifluoroacético (TFA) al 0,08 % en agua; disolvente B = acetonitrilo al 40 % en TFA al 0,08 %). La pureza del péptido se confirmó por análisis de HPLC analítica y por

espectrometría de masas como se ha descrito previamente (Kelly y Col. 2000a, Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944).

Los péptidos con un grupo ácido carboxílico C-terminal por ejemplo Glp-Asn-ProOH pueden sintetizarse usando métodos de fase sólida convencionales empleando por ejemplo una resina de Tritilo de H-Pro-2-Cl (capacidad de carga: 0,7 mmol g⁻¹). Esta resina se hinchó usando DCM y se lavó con DMF. Cada aminoácido (3 eq.) se acopló en la resina con HBTU/DIPEA (3:6 eq.) en cada etapa. El tiempo de reacción en cada etapa fue 1 h. La desprotección, el corte de la resina y la precipitación del producto se llevaron a cabo como se describe anteriormente.

Las carboxamidas de los péptidos de la presente invención pueden prepararse por fase en solución convencional acoplando la amina apropiada al péptido que contiene un grupo ácido carboxílico C-terminal. Por ejemplo, las carboxamidas de Glp-Asn-ProOH pueden prepararse como sigue: a una solución en agitación de Glp-Asn-ProOH (0,15 mmol) en DMF (560 ml, 0,26 M), se añadieron HOBt (1,0 eq.) y DCC (1,0 eq.), seguido de la amina requerida (1,2 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El resto se lavó con éter de petróleo y se precipitó con éter de dietilo. El producto se purificó usando una HPLC como se describe anteriormente. La pureza del péptido se confirmó como se ha descrito anteriormente.

Glp-Asn-ProNH₂, Glp-Asn-Pro-TyrNH₂, Glp-Asn-Pro-Trp-Ser-TyrNH₂, Glp-Asn-Pro-Trp-TyrNH₂, Glp-Asn-Pro-TrpNH₂, Glp-Asn-Pro-Tyr-TrpNH₂, Glp-Asn-Pro-Tyr-Trp-TrpNH₂, Glp-Asn-Pro-AMC, Glp-Asn-Pro-Trp-AMC, Glp-Asn-Pro-Trp-Trp-AMC, Glp-Asn-Pro-Tyr-Trp-AMC, Glp-Asn-Pro-Tyr-Trp-Trp-AMC, Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂, Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-Trp-D-TrpNH₂, Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpAMC, Glp-Asn-Pro-D-Trp-D-TyrAMC y Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-Trp-D-TrpAMC se sintetizaron a petición del cliente por la American Peptide Company (Sunnyvale, California, EE.UU.) o por PolyPeptide Laboratories GmbH (Alemania) a petición del presente inventor en condiciones de confidencialidad. La TRH y la TRH-AMC se obtuvieron de Sigma-Aldrich y Bachem UK Ltd, respectivamente. La homogeneidad y la identidad de cada péptido se confirmaron por HPLC y análisis espectral de masas. Todos los péptidos se almacenaron a -20 °C.

Ejemplo de preparación de Glp-Asn-ProAMC por American Peptide Company

24H27N5O7 MW 497,5

Procedimiento de preparación del péptido:

Este péptido se preparó por química en fase de solución. La American Peptide Company proporciona aminoácidos Boc y resina. El DCM, el DMF y los disolventes Biograde relacionados se obtuvieron de Fisher Scientific. Boc-Pro; Boc-Asn; Glp; BOP y AMC x g de AMC se disolvieron en DMF. El reactivo BOP y Boc-Pro se añadieron a la mezcla de reacción durante un periodo de dos horas. Se deja a la reacción reaccionar durante ~2 horas. Se usa el procedimiento de tratamiento convencional para generar un análogo Boc-ProAMC. Siguiendo a la retirada del grupo Boc del Boc-ProAMC, se añadió Boc-Asn junto con un agente de acoplamiento. Se obtuvo Boc-Asn-ProAMC. Repitiendo el mismo proceso se acopló Glp a la secuencia. Ya que no se empleó ninguna protección, la etapa de rotura HF se evitó. Sin embargo, si se hubiera usado Boc-Asn(Xan), la etapa HF hubiera sido necesaria. Después de la etapa de rotura HF, extraer el ACN/H₂O. El péptido bruto se purifica por RP-HPCL.

HPLC preparativa, Shimadzu 8-LC

HPLC analítica Shimadzu 10-LC

Columna analítica YMC 5 micras C18

Columna preparativa RP-HPCL 7,62 cm (3 pulgadas) Varian 10 micras C18

Recoger esas fracciones >95. Secarlo sobre un liofilizador Virtis y se obtuvo un polvo blanco con buen rendimiento.

El material se ensayó finalmente y se liberó por QC con ese parámetro especificado en COA. El Glp-Asn-ProAMC preparado por este proceso mostró el peso molecular correcto en el análisis Espectral de Masas. Tenía una solubilidad de 0,5 mg en 0,5 ml de agua.

Análisis RP-HPLC

Columna: 4,6 m d.i. x 250: vydac, c18, 5 micras

Otros: C: 1,5 ml/min

Tampón A: TFA al 0,1 % en agua Tampón B: TFA al 0,1 % en CAN

Longitud de onda 215 nm

C:\CLASS-VP\METHODS\5-35% 20 25.met

Tiempo de retención 13,7 min

Los derivados de este tipo se han sintetizado previamente por procedimientos de fase sólida en solución bien conocidos usando química Boc (Zimmerman y Col. 1977, Fujiwara & Tsuru, 1978). Glp-Asn-ProAMC y otros compuestos de la presente invención pueden sintetizarse utilizando tales procedimientos que son fácilmente entendibles por los expertos en la materia. Como tal, el procedimiento experimental anterior utilizado por APC para proporcionar Glp-Asn-ProAMC en el presente documento solamente es ejemplar de los métodos adecuados y esto no debería considerarse que limite la presente invención.

La eficacia de los compuestos de la presente invención para inhibir la TRH-DE y o unirse al receptor o receptores de

la TRH y para provocar y o amplificar los efectos centrales de la TRH se describe a continuación.

Inhibición de la TRH-DE purificada:

Se determinó la capacidad de los compuestos para hidrolizarse por y para inhibir la TRH-DE purificada de cerebro porcino usando ensayos cinéticos como se ha descrito previamente (Kelly y Col. 1999, 2000a, 2000b, Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944). Los valores de K_i para una serie de análogos C-terminalmente extendidos de Glp-Asn-ProNH₂ se presentan en la Tabla I. De forma significativa, puede verse que la mejora sustancial en la potencia puede lograrse a través de la extensión C-terminal de Glp-Asn-ProNH₂ mediante L-aminoácidos. El más potente de los compuestos ensayados fue Glp-L-Asn-L-Pro-L-Tyr-L-Trp-L-TrpAMC con una K_i de 1 nM. También puede verse a partir de la Tabla I que el remplazamiento de L-aminoácidos por D-aminoácidos en la extensión C-terminal no dio lugar a un cambio significativo en la potencia inhibidora. [JAK 1, JAK 2, JAK 3, JAK 4 y JAK 5 se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944].

Tabla I Valores de K_i para los inhibidores de la TRH-DE

I.D	Péptido	K_i (nM)
JAK 1	Glp-Asn-Pro-L-Tyr-L-Trp-L-Trp-AMC	1 ¹
JAK 1D	Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-Trp-D-TrpAMC	30 ¹
JAK 2	Glp-Asn-Pro-L-Tyr-L-Trp-AMC	40
JAK 2D	Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpAMC	100
JAK 4D 'JAKD'	Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpNH ₂	110
JAK 3	Glp-Asn-Pro-L-Tyr-L-Trp-L-TrpNH ₂	730
JAK 4	Glp-Asn-Pro-L-Tyr-L-Trp-NH ₂	780
JAK 5	Glp-Asn-Pro-AMC	970*
JAK 6	Glp-Asn-ProNH ₂	16.100*
JAK 7D	Glp-His-Pro-D-Tyr-D-TrpNH ₂	19.580*

Se usó el análisis de HPLC, como se ha descrito previamente (Kelly y Col. 2000a, Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944), para evaluar la capacidad de cada compuesto listado anteriormente para actuar como un sustrato de la TRH-DE. Se encontró que todos los compuestos mostrados anteriormente eran resistentes a la hidrólisis por la TRH-DE. Los compuestos se examinaron después para su capacidad de inhibir la TRH-DE purificada de cerebro porcino usando ensayos fluorométricos, como se ha descrito previamente (Kelly y Col., 2000a, Solicitud de Patente de EE.UU. n° 20030166944). Los valores de K_i se determinaron por análisis de regresión no lineal de los datos recogidos por duplicado en cinco concentraciones de sustrato diferentes y al menos tres concentraciones de péptido diferentes o se calcularon a partir de determinaciones por triplicado del % de inhibición usando la relación $v_i/v_o = i = [I]/([I] + K_i (1 + [S]/K_m))$, donde v_i y v_o son las velocidades iniciales medidas en presencia y ausencia de inhibidor, respectivamente, e i , $[I]$, K_i , $[S]$ y K_m representan la cantidad de inhibición, la concentración de inhibidor, la constante de inhibición, la concentración de sustrato y la constante de Michaelis, respectivamente. El valor * K_i representa la media de 11 determinaciones separadas llevadas a cabo en días diferentes.

Inhibición de TRH-DE en Rebanadas de Cerebro

La recuperación aumentada de un neuropéptido liberado a partir de rebanadas de cerebro por despolarización en presencia de un inhibidor de peptidasa selectivo se toma por la técnica para indicar un papel para esa peptidasa en el metabolismo del péptido endógenamente liberado y notablemente, para indicar la capacidad de un inhibidor para proteger el péptido endógeno de la degradación en un medio más fisiológicamente intacto.

Las rebanadas hipotalámicas se prepararon a partir de cerebro de rata y se evaluó la capacidad de los inhibidores de la TRH-DE para proteger la TRH endógena de la degradación midiendo la recuperación de la TRH liberada de las rebanadas de cerebro en condiciones basales y de despolarización. Los hipotálamos se diseccionaron rápidamente de ratas Wistar macho (200-250 g) siguiendo a la decapitación y se cortaron rebanadas (300 x 300 μ m) con un cortador de tejidos Mcllwain. Cada incubación contenía rebanadas del hipotálamo de un animal. Las rebanadas se incubaron inicialmente en un tubo de plástico de fondo plano en tampón Krebs de 0,5 ml libre de Ca²⁺ gasificado con oxígeno al 95 %/dióxido de carbono al 5 % durante 10 min en un baño de agua de agitación a 37 °C. Después de 10 min el tampón libre de Ca²⁺ se reemplazó por tampón Krebs que contiene Ca²⁺ (2,5 mM) y se continuó la incubación durante unos 10 minutos adicionales. Los tubos se centrifugaron después a 2.000 g durante 10 min. El sobrenadante resultante se retiró y se tomó para denominarse liberación "basal". Posteriormente, el tejido se incubó a 37 °C durante 10 min en tampón que contiene Ca²⁺ y KCl (50 mM) y el sobrenadante que surge de esta incubación se tomó para representar la liberación "estimulada". El inhibidor de la TRH-DE en una concentración final de 0,1 mM o el vehículo (1ml de solución salina o DMSO) estuvieron presentes a lo largo de todas las dos últimas incubaciones. Las muestras de sobrenadante se congelaron a -80 °C hasta que se analizaron para el contenido de la TRH por

radioinmunoensayo (Lighton y Col. 1984).

Los datos presentados en la Figura 1 demuestran que la recuperación de la TRH liberada de las rebanadas de cerebro de rata en condiciones basales y de despolarización se aumentaron significativamente por la presencia de un inhibidor de la TRH-DE.

5 *Unión al Receptor de la THR:*

Los ensayos de unión a radioligando se llevaron a cabo para examinar la capacidad de estos inhibidores de la TRH-DE para unirse a los receptores de la TRH. Esto se logró midiendo la capacidad de los inhibidores para desplazar la [³H][3-Me-His²]THR unida a las membranas corticales de rata. Las membranas se prepararon a partir de la corteza de ratas Wistar macho. La unión de la [³H]-3MeHis-THR a los receptores de la TRH en las membranas corticales se midió como se ha descrito previamente (Kelly y Col., 2002) usando TRH 10 nM para definir la unión no específica. La afinidad de los inhibidores de la TRH-DE por los receptores de la TRH se determinó en experimentos de competición y los datos se analizaron usando GraphPad Prism. Los resultados se resumen en la Tabla II y en la Figura 2. Los estudios previos habían mostrado que tanto Glp-Asn-ProNH₂ (JAK 6) como Glp-Asn-ProAMC (JAK 5) tenían relativamente baja afinidad en comparación con la TRH por los receptores marcados de [³H]-3Me-His-THR en membranas corticales de rata (Kelly y Col., 2002). Inesperadamente, los datos presentados en la Tabla II y en la Figura 2 demuestran que los análogos C-terminalmente extendidos de Glp-Asn-ProNH₂ que contienen D-aminoácidos son más potentes desplazando la [³H]-3Me-His-THR de los receptores de la TRH corticales de rata nativos que los análogos correspondientes que contienen L aminoácidos. El orden de rango de potencia de los isómeros D inhibidores fue JAK4-D > JAK2-D > JAK1-D.

20 Tabla II. Inhibición de [³H]-3MeHis-THR que se une a los receptores de la TRH corticales de rata nativos por análogos de la TRH. Todos los compuestos JAK se disolvieron en DMSO para los fines del ensayo. El valor de K_i para 3-MeHis-THR disuelta en DMSO también se determinó para comparación.

Compuesto	K _i M	
	X es un isómero D de aa	X es un isómero L de aa
JAK1	6,0 x 10 ⁻⁸	> 10 ⁻⁴
JAK2	3,7 x 10 ⁻⁸⁹	≈ 4 x 10 ⁻⁵
JAK4	5,5 x 10 ⁻⁹	1,2 x 10 ⁻⁷
TRH	n.d.	2,2 x 10 ⁻⁸
3-MeHis-TRH (en solución salina)	n.d.	1,9 x 10 ⁻⁹
3-MeHis-TRH (en DMSO)	n.d.	7,4 x 10 ⁻⁸
JAK7	1,0 x 10 ⁻⁶	n.d.

25 Los resultados descritos anteriormente demuestran claramente que los análogos extendidos C-terminalmente de Glp-Asn-ProNH₂ que contienen D aminoácidos en la extensión C-terminal se unen a los receptores marcados [³H]-3MeHis-THR en la corteza cerebral con mayor afinidad que la TRH, así como inhiben la TRH-DE con potencia nanomolar. De forma notable JAK 2D y JAK 4D muestran mayor afinidad por los receptores marcados [³H]-3MeHis-THR en la corteza cerebral de rata más que la 3MeHis-TRH.

Efectos farmacológicos in vivo:

30 El antagonismo de la anestesia inducida por barbiturato es un efecto farmacológico bien reconocido de la TRH y se usa en la técnica para indicar la liberación central satisfactoria y la actividad de los análogos dela TRH.

35 La capacidad de Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂ para provocar este efecto analéptico de la TRH sea evaluó y se comparó con el de la TRH. Unas ratas Wistar macho (150-250 g) se anestesiaron con pentobarbitona sódica (30 mg/kg i.p.). Después de 10 minutos, se administraron TRH (1 mg/kg) o Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂ (1 mg/kg) i.v. Los animales se colocaron sobre sus espaldas y se grabaron los tiempos de sueño. A partir de la Tabla III puede verse que tanto Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂ como la TRH reducen significativamente (p<0,05, ensayo de la t de Student) el tiempo de sueño inducido por barbiturato en ratas.

Tabla III Efectos de la TRH y de JAK 4D en el tiempo de sueño inducido por barbiturato.

Tratamiento	Tiempo de sueño (min)	n
Control	70,9 ± 5,1	16
1 mg/kg de TRH	54,5 ± 4,3*	13
1 mg/kg de JAK4D	54,1 ± 2,4**	6

Los datos son medias \pm la desviación estándar de n=6-16 experimentos. *p<0,05, **p<0,01 frente al control (ensayo de la t de Student). Este efecto analéptico se midió determinando la capacidad de los péptidos de ensayo para reducir la narcosis inducida por barbiturato. Unas ratas Wistar macho (150-250 g) se anestesiaron con pentobarbitona sódica (30 mg/kg i.p.). Después de 10 minutos, se administró el péptido de ensayo i.v. Los animales se colocaron sobre sus espaldas y se grabaron los tiempos de sueño.

Efectos de comportamiento:

La TRH ha mostrado producir varias respuestas de comportamiento características cuando se administra a las ratas por inyección periférica o central. Esto incluye actividad locomotora aumentada (21-22), inducción de parpadeo y lamer la pata y comportamiento de agitar el cuerpo, normalmente denominado "agitaciones de perro mojado (APM)" Kelly y Col., 2000b. Previamente JAK y compañía habían demostrado que Glp-Asn-ProNH₂ y JAK 5 pueden amplificar estos efectos centrales de la TRH *in vivo* (Kelly y Col., 2000b). Como se ha mencionado anteriormente, se encontró que ambos de estos inhibidores de la TRH-DE tenían baja afinidad en comparación con los receptores marcados [³H]-3MeHis-TRH en las membranas corticales de rata, apoyando la interpretación de que la inhibición de la TRH-DP respalda sus efectos de comportamiento observados.

Los efectos de la TRH y de los inhibidores de la TRH-DE en el comportamiento de las ratas se midieron como se ha descrito previamente (Kelly y Col., 2000b). Unas ratas Wistar macho (150-250 g) se colocaron en cajas de plexiglás individuales y se dejaron aclimatar durante 20 min. Después se administró a las ratas vehículo o inhibidor (0,1-10 mg/kg i.p. como se ha indicado), seguido 15 min después de un segundo tratamiento con vehículo o bien TRH (1-20 mg/kg i.p. como se ha indicado). Se grabaron los comportamientos individuales durante 30 s a intervalos de 5 min por un observador que era ciego al tratamiento. Los comportamientos durante cada periodo de observación se sumaron para producir una puntuación de actividad total.

La TRH (5-50 mg/kg) produjo un aumento en la actividad dependiente de la dosis (Figura 3) (p<0,001 ANOVA). Las respuestas de comportamiento a 20 y 50 mg/kg de TRH fueron similares indicando que podía haberse alcanzado un efecto cielo.

Puede verse que JAK4-D (0,1 - 5 mg/kg) produce un aumento transitorio en las puntuaciones de actividad de las ratas espontáneas en comparación con los controles tratados con vehículo. Esto fue estadísticamente significativo para 0,1 mg/kg de JAK4-D durante el periodo de 35-45 min (p<0,05 y p<0,001 respectivamente, ANOVA de dos factores) (Figura 4). La respuesta producida por 1 mg/kg de JAK4-D era comparable a la producida por 5 mg/kg de TRH (Figura 5). El pre-tratamiento de las ratas con 0,1 mg/kg JAK4-D potenció el efecto estimulante de 10 mg/kg de TRH 15-20 min después de la administración de la TRH (p<0,05 frente a la TRH sola, ANOVA de dos factores). 1 mg/kg de JAK4-D potenció y prolongó las respuestas a la TRH durante el periodo de observación entero (p<0,0001 frente a la TRH, ANOVA de dos factores) (Figura 6). Es notable que la coadministración de 0,1 mg/kg de JAK4D con 10 mg/kg de TRH provocó respuestas equivalentes a aquellas obtenidas por 20 y 50 mg/kg de TRH.

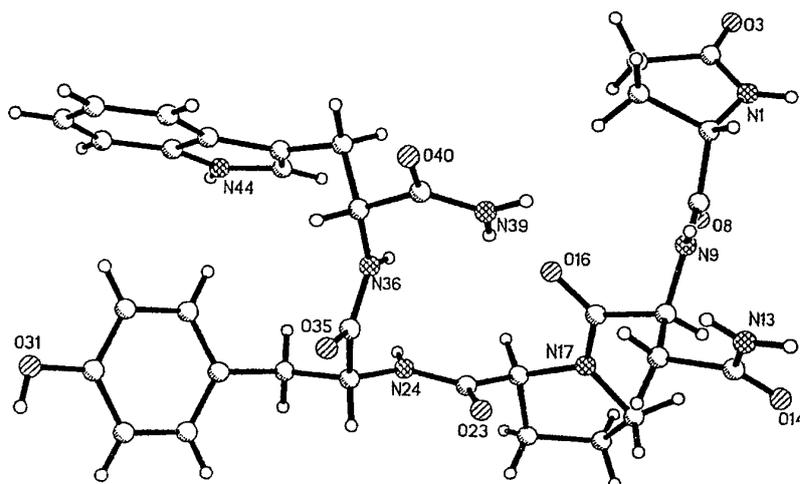
Los efectos de la TRH y de los inhibidores de la TRH-DE en el comportamiento de agitación de perro mojado (APM) se midieron como sigue: unas ratas Wistar macho (150-250 g) se colocaron en cajas de plexiglás individuales y se dejaron aclimatar durante 20 min. Después se les administró vehículo o inhibidor (0,1-10 mg/kg i.p. como se ha indicado), seguido 15 min después de un segundo tratamiento con vehículo o bien TRH (1-20 mg/kg i.p. como se ha indicado). Los animales se grabaron en vídeo y las cintas se evaluaron posteriormente para el número de APM que ocurrían durante 5 min de periodos de observación. Se encontró que la TRH provoca un aumento de las APM dependiente de la concentración. Se grabaron los números máximos de APM 5 min después de la administración de la TRH y los efectos de la TRH persistían durante aproximadamente 20 min (Figura 7).

1 mg/kg de JAK4-D aumentó la ocurrencia de APM a un nivel que era comparable con la respuesta producida por 5 mg/kg de TRH (Figura 8). Además, el pre-tratamiento con 1 mg/kg de JAK4-D potenció la respuesta de pico de APM a 10 mg/kg de TRH (p<0,01, ensayo de la t) (Figura 9).

Análisis cristalográficos

Los cristales de Glp-Asn-Pro-DTyr-DTrpNH₂ (JAK4D) se hicieron crecer a partir de una mezcla de DMSO (15 % v/v) y solución salina. Los datos del análisis cristalográfico por rayos x son coherentes con y confirman la estereoquímica del péptido sintetizado y que el compuesto es enantioméricamente puro. La estructura absoluta se confirmó por examinación del parámetro x de Flack.

Estructura de Glp-Asn-Pro-DTyr-DTrpNH₂ (JAK4D) como se determinó por análisis de un cristal único:-

Tabla 1. Datos del cristal y refinamiento de la estructura para L-Glp-L-Asn-L-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂

Código de identificación	L-Glp-L-Asn-L-Pro-D-Tyr-D-TrpNH ₂
Fórmula empírica	C ₃₈ H ₅₆ N ₈ O ₁₃ S ₂
Peso de la fórmula	899,04
Temperatura	-120,15 °C (153(2) K)
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monocíclico
Grupo espacial	P(2) ₁
Dimensiones de celda unitaria	a = 12,4656(7) Å α = 90°. b = 11,2767(7) Å β = 90,9110(10)°. c = 15,6497(9) Å γ = 90°.
Volumen	2199.6(2) Å ³
Z	2
Densidad (calculada)	1,357 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0,192 mm ⁻¹
F(000)	956
Tamaño del cristal	0,45 x 0,41 x 0,24 mm ³
Intervalo theta para la colección de datos	1,63 a 27,50°
Intervalos de índices	-16<=h<=16, -14<=k<=14, -18<=l<=20
Reflejos recogidos	21457
Reflejos independientes	10060 [R(int) = 0,0248]
Integridad hasta theta = 27,50°	99,9 %
Corrección de absorción	Semi-empírica desde equivalentes
Transmisión máxima y mínima	0,9553 y 0,8099
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	10060 / 3 / 568
Bondad de ajuste a F ²	1,046
Índices R finales [I>2σ(I)]	R1 = 0,0547, wR2 = 0,1423
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0600, wR2 = 0,1474
Parámetro de estructura absoluta	-0,01(7)
Mayor pico y hueco dif.	0,888 y -0,449 e.Å ⁻³

5 Tabla 2. Coordinados atómicos (x 10⁴) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente (Å² x 10³) para L-Glp-L-Asn-L-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂. U (eq) se define como un tercio de la traza del tensor U^{ij} ortogonalizado.

ES 2 546 015 T3

	x	y	z	U(eq)
N(1)	-691(2)	9195(2)	4355(1)	23(1)
C(2)	30(2)	10055(2)	4386(2)	25(1)
O(3)	124(2)	10856(2)	3841(1)	31(1)
C(4)	692(2)	9930(3)	5199(2)	32(1)
C(5)	464(2)	8670(3)	5491(2)	33(1)
C(6)	-640(2)	8383(2)	5072(2)	24(1)
C(7)	-1536(2)	8582(2)	5704(2)	20(1)
O(8)	-1991(2)	9535(2)	5779(1)	27(1)
N(9)	-1748(2)	7618(2)	6181(1)	20(1)
C(10)	-2482(2)	7697(2)	6888(2)	20(1)
C(11)	-2635(2)	6462(2)	7279(2)	25(1)
C(12)	-3238(2)	5659(2)	6647(2)	27(1)
N(13)	-2709(2)	4703(2)	6380(2)	33(1)
O(4)	-4135(2)	5924(2)	6409(2)	43(1)
C(15)	-2046(2)	8526(2)	7586(2)	17(1)
O(16)	-1070(1)	8655(2)	7690(1)	22(1)
N(17)	-2763(2)	9020(2)	8094(1)	17(1)
C(18)	-3945(2)	9016(2)	8013(2)	23(1)
C(19)	-4272(2)	10045(2)	8578(2)	22(1)
C(20)	-3441(2)	10020(2)	9306(2)	24(1)
C(21)	-2394(2)	9605(2)	8878(2)	16(1)
C(22)	-1794(2)	8699(2)	9433(1)	16(1)
O(23)	-2001(2)	7637(2)	9402(1)	25(1)
N(24)	-1046(2)	9143(2)	9974(1)	15(1)
C(25)	-460(2)	8358(2)	10552(1)	15(1)
C(26)	125(2)	9114(2)	11240(2)	20(1)
C(27)	875(2)	8397(2)	11805(2)	18(1)
C(28)	509(2)	7755(2)	12498(2)	23(1)
C(29)	1200(2)	7032(2)	12972(2)	24(1)
C(30)	2270(2)	6942(2)	12760(2)	19(1)
O(31)	2979(2)	6234(2)	13196(1)	26(1)
C(32)	2653(2)	7609(2)	12082(2)	22(1)
C(33)	1960(2)	8326(2)	11615(2)	20(1)
C(34)	331(2)	7565(2)	10081(1)	15(1)
O(35)	496(1)	6542(2)	10348(1)	20(1)
N(36)	873(2)	8036(2)	9433(1)	16(1)
C(37)	1793(2)	7424(2)	9070(2)	17(1)
C(38)	1541(2)	6631(2)	8295(2)	19(1)
N(39)	666(2)	6866(2)	7835(1)	23(1)
O(40)	2181(2)	5850(2)	8127(1)	31(1)
C(41)	2657(2)	8327(2)	8795(2)	19(1)
C(42)	3086(2)	9096(2)	9508(2)	19(1)
C(43)	2729(2)	10199(2)	9710(2)	21(1)
N(44)	3306(2)	10650(2)	10392(1)	23(1)
C(45)	4070(2)	9828(2)	10635(2)	20(1)
C(46)	4859(2)	9884(3)	11283(2)	26(1)
C(47)	5530(2)	8916(3)	11381(2)	28(1)

(continuación)

	x	y	z	U(eq)
C(48)	5422(2)	7915(3)	10853(2)	29(1)
C(49)	4648(2)	7861(2)	10208(2)	23(1)
C(50)	3953(2)	8834(2)	10091(2)	19(1)
S(60)	3903(1)	7583(1)	5607(1)	40(1)
C(61)	3645(4)	7810(4)	6708(2)	58(1)
C(62)	3448(4)	6082(4)	5543(3)	61(1)
O(63)	3110(2)	8321(3)	5115(2)	56(1)
S(70)	5519(1)	6343(1)	3738(1)	45(1)
C(71)	6628(3)	6557(5)	4451(3)	60(1)
C(72)	5229(3)	7870(4)	3526(2)	47(1)
O(73)	5969(2)	5829(3)	2935(2)	57(1)
O(80)	9498(2)	5198(2)	1608(1)	23(1)
O(81)	2178(2)	3951(2)	6998(1)	29(1)
O(82)	2168(3)	1732(3)	7721(2)	63(1)

Referencias bibliográficas

- 5 Charli, J.-L., Mendez, M., Vargas, M.-A., Cisneros, M., Assai, M., Joseph-Bravo, P., y Wilk, S. (1989) *Neuropeptides* 14, 191-196
- Faden A.I., & Salzman, S. (1992) *Trends Pharmacol Sci.* 13, 29-35
- Fischer, P.M. (2003) *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 339-356
- Fujiwara K. y Tsuru D., *J. Biochem.* (1978) 83, 1145-1149
- Gershengorn MC, Osman R. (1996) *Physiol Rev.* 76(1),175-91
- 10 Horita, A. (1998) *Life Sci.* 62, 1443-1448
- Hruby VJ. (2002) *Nat Rev Drug Discov.* 1(11), 847-58
- Karle, I.L., Gopi, H.N., y Balaram, P. (2003) *PNAS* 100, 13946-13951
- Kelly JA. (1995) *Essays Biochem.* 30, 133-49
- Kelly JA, Slator GR, Tipton KF, Williams CH, Bauer K. (1999) *Anal Biochem.* 274(2), 195-202
- 15 Kelly JA, Slator GR, Tipton KF, Williams CH, Bauer K. (2000a) *J. Biol. Chem.* 275(22), 16746-51
- Kelly JA, Bennett GW, Beckett S, Slator GR, Roe CH, O'Loinsigh ED, y O'Boyle KM. (2000b) *Br. J. Pharmacol.* 133, 187P
- Kelly, J. A., Slator, G. R., O'Boyle, K. M. (2002) *Biochem. Pharmacol.* 63, 2197-2206
- Leng, N., Grasso P. y Reichert L.E. Jr. (1996) *Pept. Res.* 9, 188-194
- 20 Lighton, C., Marsden, C. A., and Bennett, G. W. (1984) *Neuropharmacology* 23, 55-60
- Luo L, Yano N, Mao Q, Jackson IM, Stopa EG. (2002) *J Alzheimers Dis.* 4(2), 97-103
- Magdolen, V., Burgle, M., de Prada, N.A., Schmiedeberg, N., Reimer, C., Schroeck, F., Kellerman, J., Degitz, K., Wilhelm, O.G., Schmitt, M., y Kessler, H. (2001) *Biol. Chem.* 382, 1197-1205
- McMurry, J. (1984) *Organic Chemistry Brooks/Cole Publishing Company U.S.A.*
- 25 O'Cuinn, G., O'Connor, B., y Elmore, M. (1990) *J. Neurochem.* 54, 1-13
- Pascual, I., Gil-Parrado, S., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., Diaz, J., Possani, L. D., Charli, J. L., y Chavez, M. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36,138-152

Sato, K., Hotta, M., Kageyama, J., Chaing, T.C., Hu, H.Y., Dong, M.H., y Ling, N. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 531-537

Schechter, I., and Berger, A. (1967) *Biochem. Biophys. Res Commun.* 27, 157-162

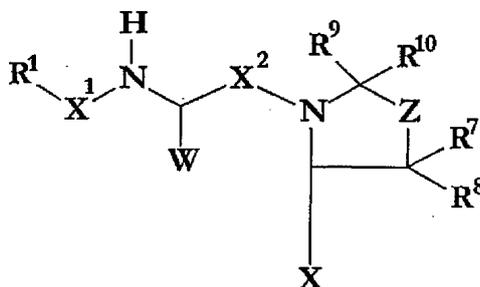
Sharif NA (1989) *Ann. NY Acad. Sci.* 553, 147-275

5 Walker, B. (1994) In *Synthetic Antigens: A Practical Approach* (Wisdom, G. B., ed) pp. 27-81, Oxford University Press, Oxford, U.K

Zimmerman M. Ashe B., Yurewicz E.C. y Patel G., (1977) *Anal. Biochem.* 78, 47-51

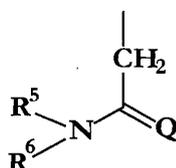
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de Fórmula I, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



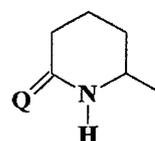
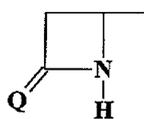
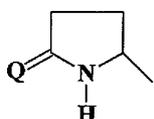
en la que

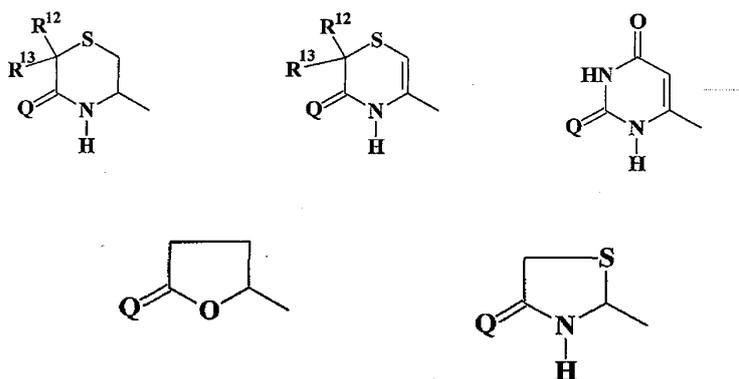
- 5 R¹ es un anillo heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros, teniendo el anillo uno o más heteroátomos que se seleccionan de O, S o N; en el que el anillo heterocíclico se sustituye opcionalmente con un oxo, tioxo; alquilo C₁-C₅; alquenilo C₁-C₅; alquinilo C₁-C₅; alcoxi C₁-C₅; arilo; halo; halo alquilo C₁-C₅; nitro; azido; ciano; hidroxilo; hidroxil alquilo C₁-C₅; un grupo SO_nR¹⁴, en la que R¹⁴ es alquilo y n = 0, 1 o 2; o un grupo carbonilo o éster de la fórmula -COOR¹⁵, en el que R¹⁵ es H o alquilo C₁-C₅ y que puede estar en la forma iónica COO⁻; y en la que
- 10 X¹ es -CO-, -CS-, -CH₂CO- o CH(R⁴), en la que R⁴ es H o alquilo opcionalmente sustituido, o -COOH o -COOR¹¹, en la que R¹¹ es alquilo C₁-C₅ opcionalmente sustituido;
- X² es -CO- o -CS-;
- Z es -CH₂-, -S-, -O- o -NH-;
- 15 R⁷ y R⁸, que pueden ser iguales o diferentes, son H o alquilo C₁-C₅ opcionalmente sustituido;
- R⁹ y R¹⁰, que pueden ser iguales o diferentes, son H, alquilo C₁-C₅ opcionalmente sustituido o un anillo carbocíclico opcionalmente sustituido; en la que los grupos alquilo C₁-C₅ opcionalmente sustituidos son halo, nitro o ciano;
- 20 W representa una cadena lateral de un resto de aminoácido, natural o no natural; en la que la cadena lateral es



- en la que
- 25 Q es O o S; y R⁵ y R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, son H o alquilo C₁-C₅; o W representa la cadena lateral de un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, histidina, leucina, tienilalanina y fenilalanina;
- X representa de 1 a 20 aminoácidos, seleccionados del grupo que consiste en fenilalanina, triptófano y tirosina que están en la configuración D, en la que el aminoácido C-terminal del resto X estando opcionalmente sustituido con un grupo amino o con 7-amino-4-metil cumarina.
- 30

2. El compuesto de la reivindicación 1 en el que X representa de 1 a 10 aminoácidos.
3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2 en el que X representa de 1 a 3 aminoácidos.
4. El compuesto de la reivindicación 1 o 2 en el que en la Fórmula I y la, Z es -CH₂- y R⁷ y R⁸ son H.
5. El compuesto de cualquier reivindicación anterior en el que R⁹ y R¹⁰ son H.
- 35 6. El compuesto de cualquier reivindicación anterior en el que X¹ y X² son -CO-.
7. El compuesto de la reivindicación 1 o 2 en el que en la Fórmula I, R¹ es seleccionado del grupo que consiste en:





en las que

- 5 R¹² es hidrógeno, alquilo C₁-C₅ o fenilo,
R¹³ es hidrógeno o alquilo C₁-C₅,
Q es O o S.

8. El compuesto de cualquier reivindicación anterior en el que en la Fórmula I, R¹ es un anillo de pirrolidona, de tiazolidinona o de butirolactona de 5 miembros.

9. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la estructura:



en la que

- 15 W' representa un resto de aminoácido con las cadenas laterales como se define en la reivindicación 1, natural o no natural; y
X representa restos de 1 a 20 aminoácidos que pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en: fenilalanina, tirosina y triptófano, que están en la configuración D, y en la que el resto aminoácido C-terminal de X está opcionalmente sustituido con un grupo amino o aminometilcumarina;

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

10. El compuesto de la reivindicación 9 en el que W' es seleccionado del grupo que consiste en asparagina, histidina, leucina, tienilalanina y fenilalanina.

20 11. El compuesto de la reivindicación 10 en el que el resto de aminoácido W' es asparagina en la configuración D.

12. El compuesto de la reivindicación 1 o 9 seleccionado del grupo que consiste en:

- 25 Glp-Asn-Pro-D-TyrNH₂,
Glp-Asn-Pro-D-TrpNH₂,
Glp-Asn-Pro-D-Trp-D-TyrNH₂,
Glp-Asn-Pro-D-Trp-D-TrpNH₂,
Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-Trp-D-TrpNH₂
Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-TrpAMC,
Glp-Asn-Pro-D-Trp-D-TyrAMC,
30 Glp-Asn-Pro-D-Tyr-D-Trp-D-TrpAMC,
Glp-Asn-Pro-D-Phe-D-TyrAMC,
Glp-Asn-Pro-D-TrpAMC,
Glp-His-Pro-D-Tyr-D-TrpNH₂, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

35 13. Compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que tiene sustituyentes presentes que no interfieren con la función de los compuestos como inhibidores de la actividad de la ectoenzima degradante de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH-DE) o en la unión a los receptores de la TRH y sus acciones como miméticos de la THR.

14. Compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en cualquier reivindicación anterior, para su uso como un medicamento.

40 15. Compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 en el que el medicamento es para inhibir la actividad de la TRH-DE, o para potenciar o reforzar las acciones de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y/o para proteger la TRH endógena y/o la TRH o los análogos de la TRH administrados exógenamente contra la

degradación por la TRH-DE o como un mimético de la TRH o un ligando del receptor de la TRH, o para la prevención, el retraso de la evolución o el tratamiento de lesiones cerebrales o medulares, u otros trastornos del sistema nervioso central, u otros trastornos dependientes de la THR en los tejidos.

5 16. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y que comprende además opcionalmente TRH o un análogo de la TRH.

10 17. Un mimético de la TRH o un inhibidor de la TRH-DE, o un mimético de la TRH y un inhibidor de la TRH-DE combinados que comprende al menos un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

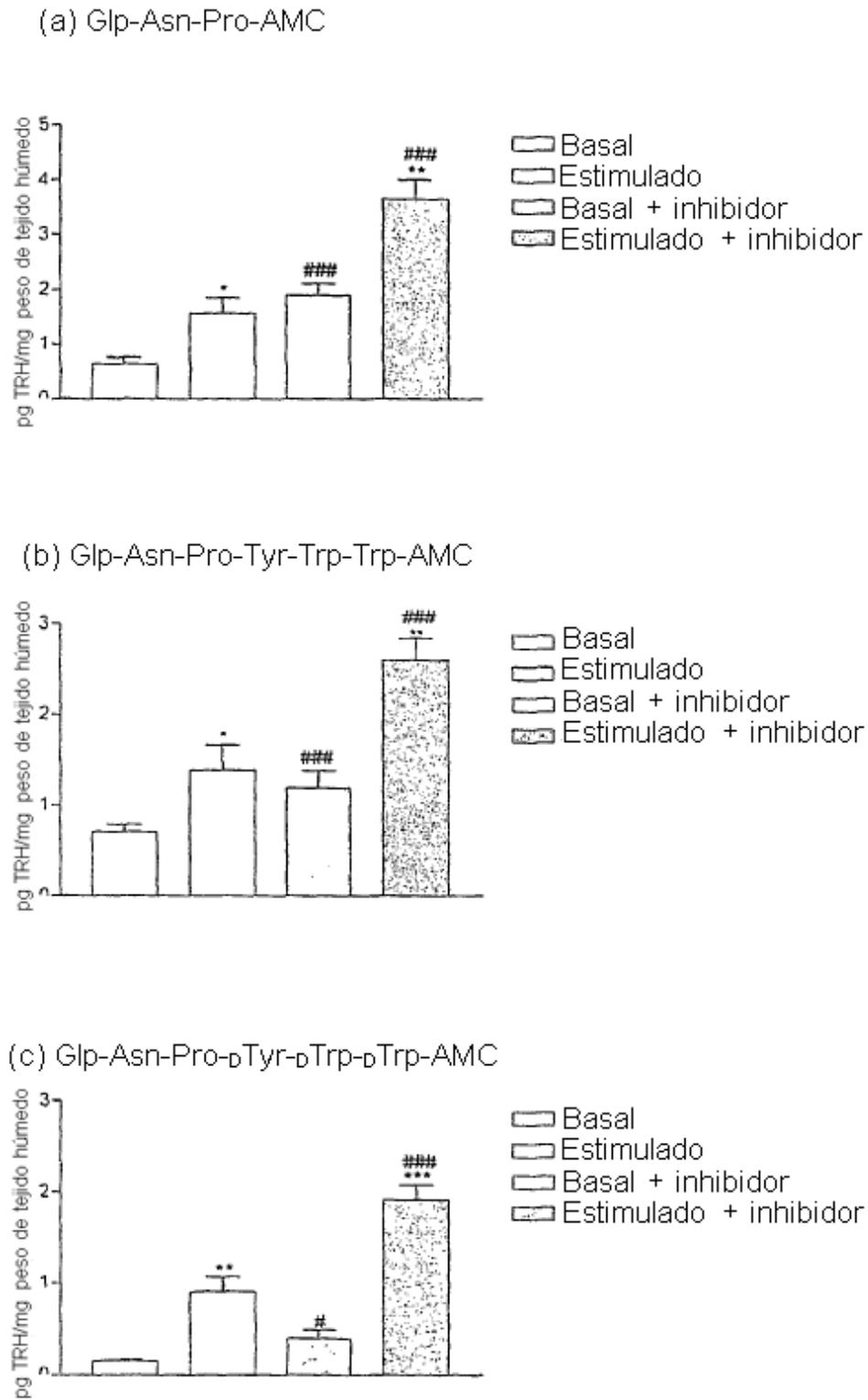


FIG. 1

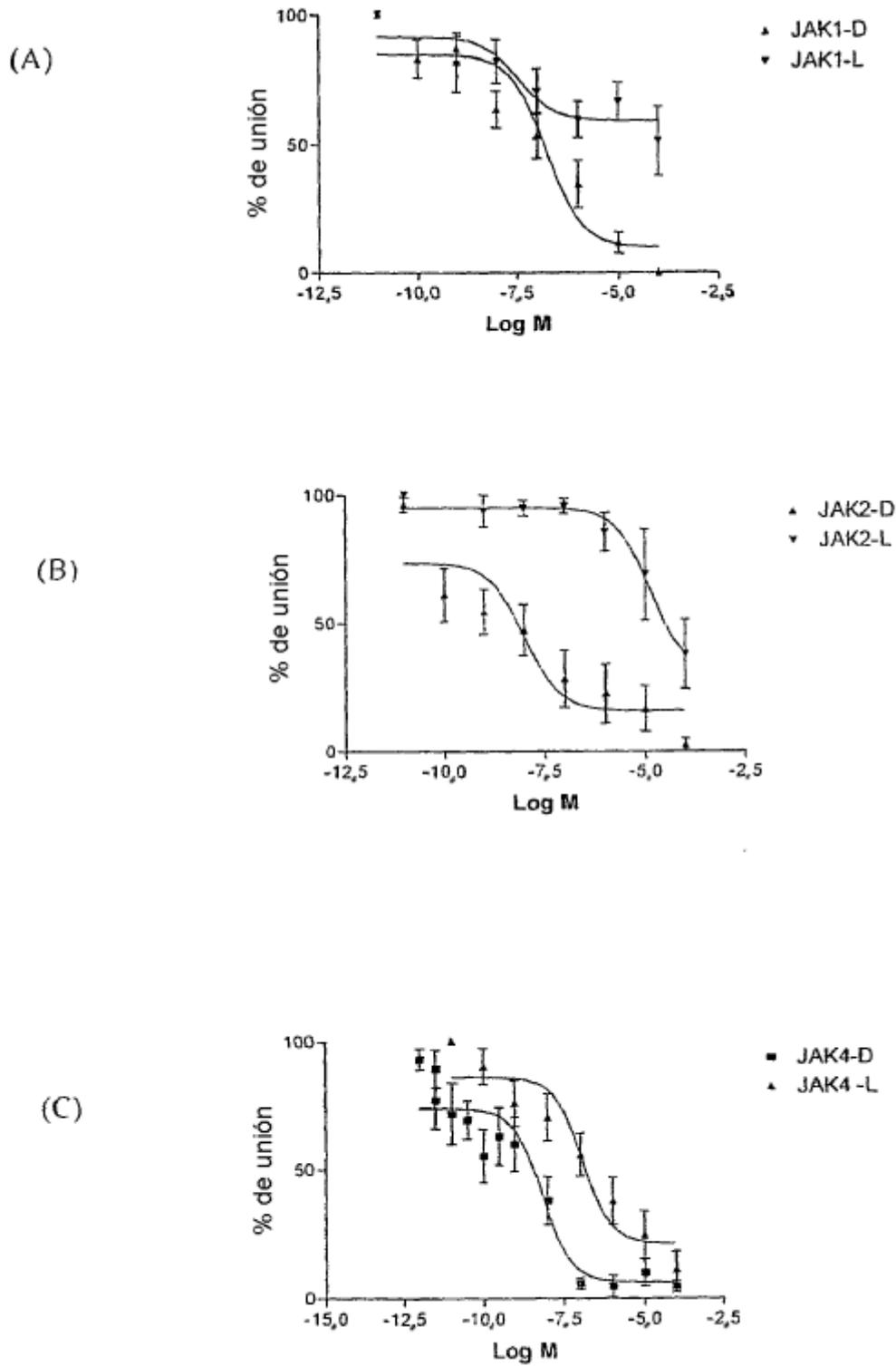


FIG. 2

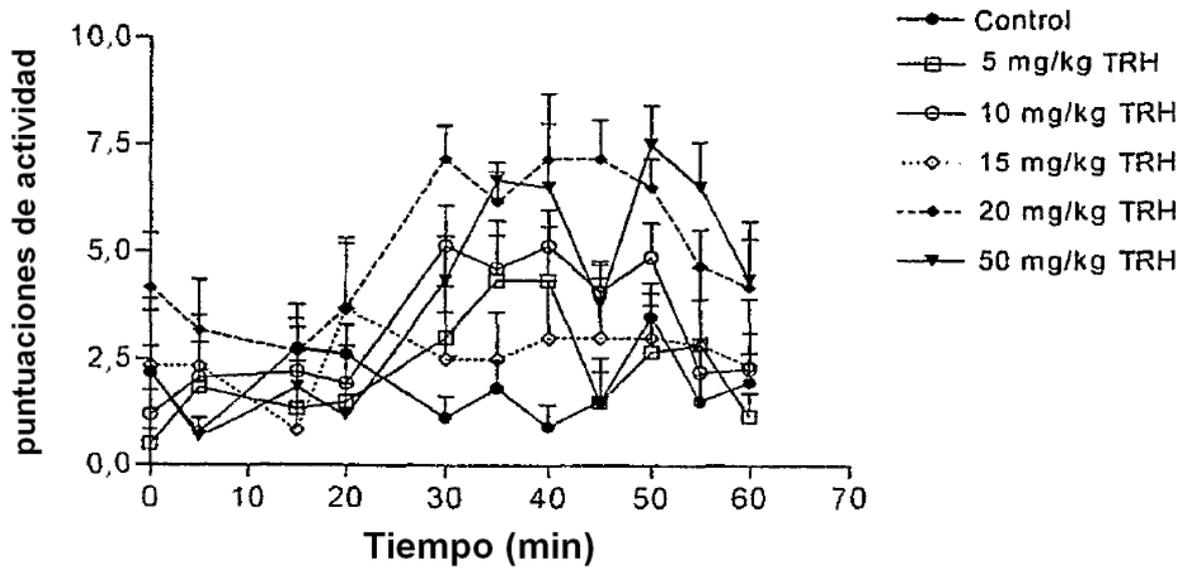


FIG. 3

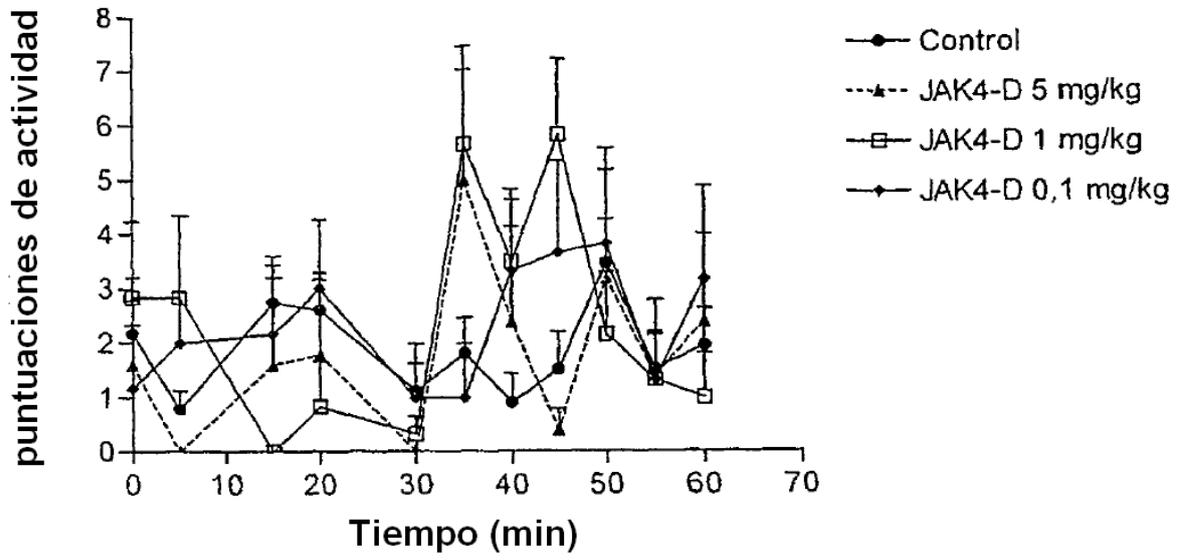


FIG. 4

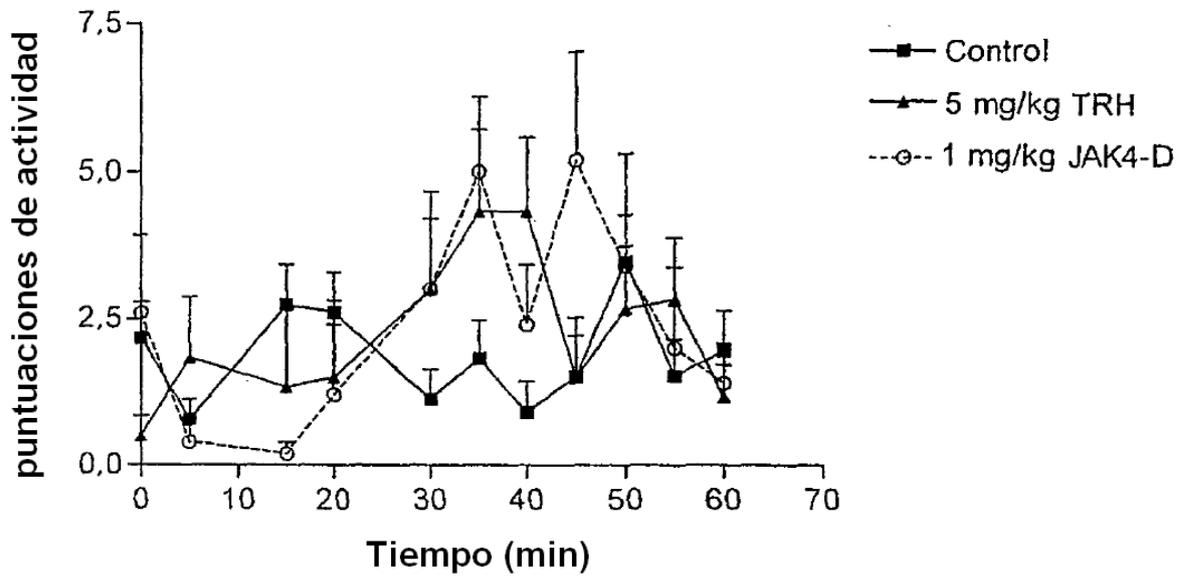


FIG. 5

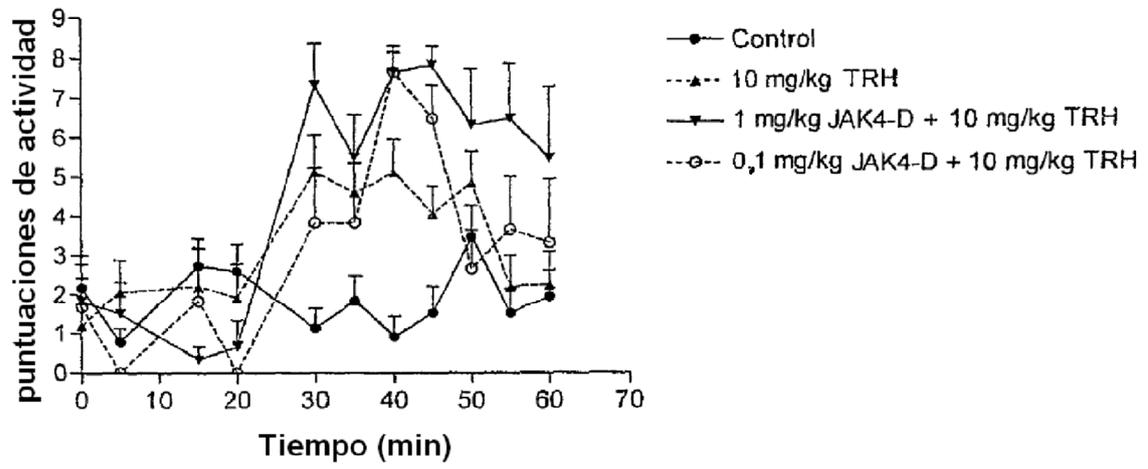


FIG. 6

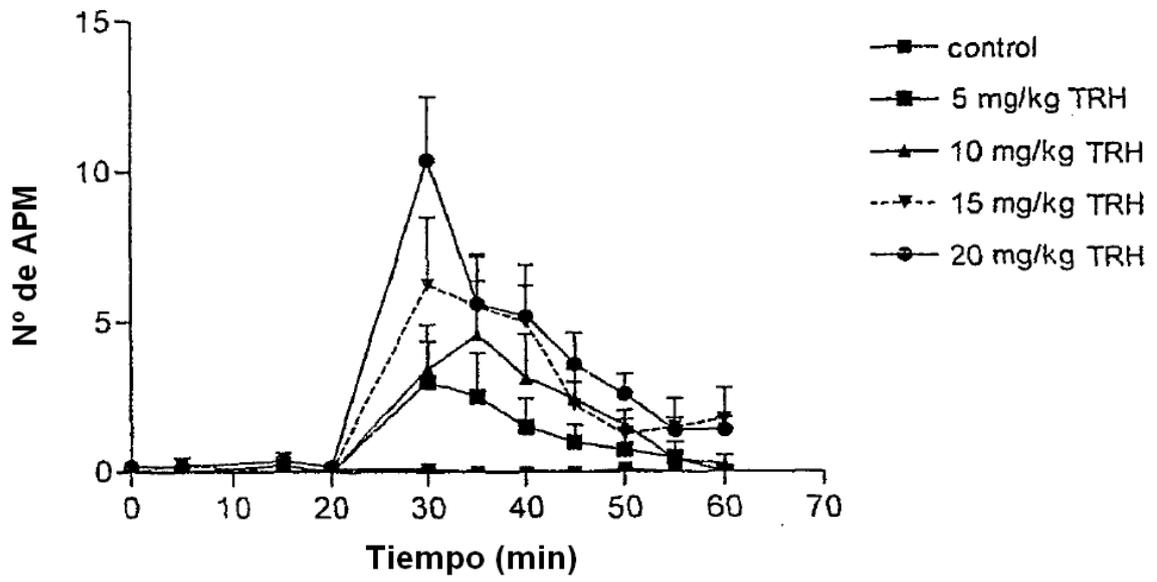


FIG. 7

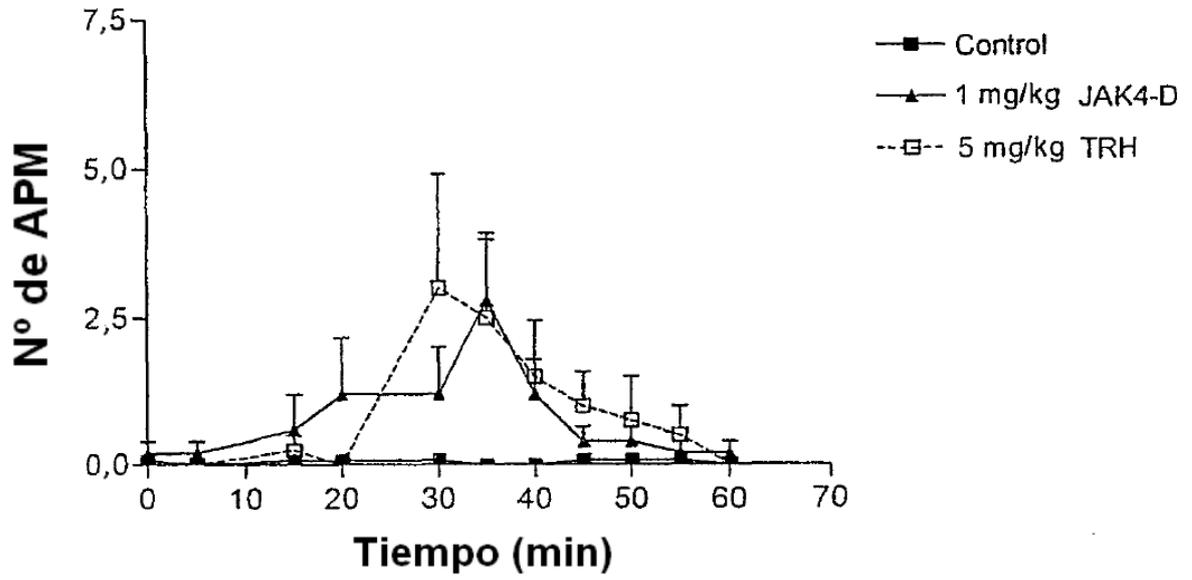


FIG. 8

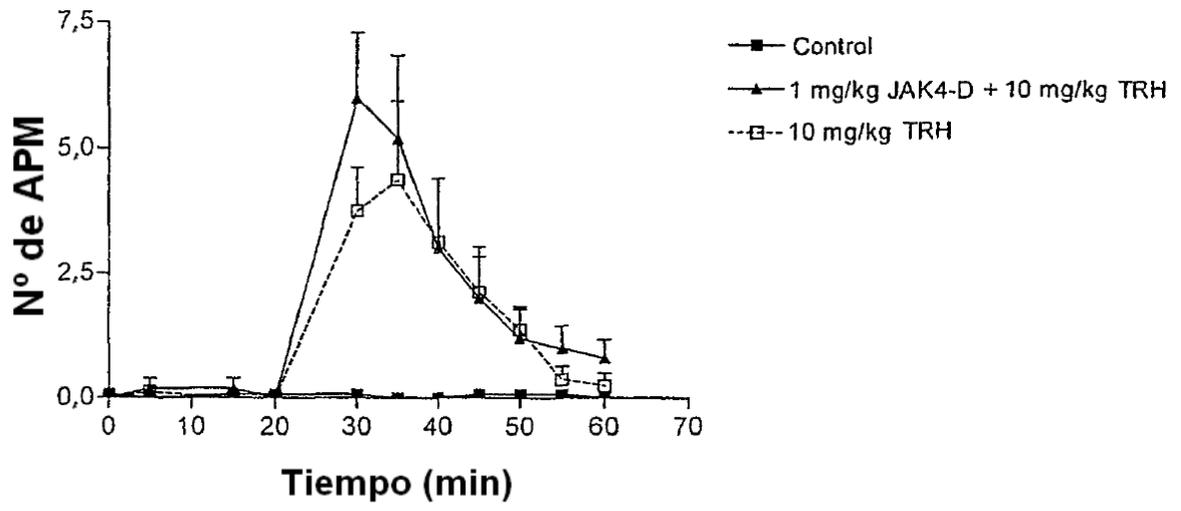


FIG. 9