

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 499**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2011 PCT/US2011/066787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12088397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011 E 11851312 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2654772**

54 Título: **Péptidos antagonistas de CRF cíclicos**

30 Prioridad:

22.12.2010 US 201061426428 P

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

11.03.2019

73 Titular/es:

**THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL
STUDIES (100.0%)
10010 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

RIVIER, JEAN E. F.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 703 499 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

Péptidos antagonistas de CRF cíclicos

La invención se define en las reivindicaciones.

- 5 Esta invención se dirige generalmente a péptidos y al tratamiento farmacéutico de mamíferos usando estos péptidos. Más específicamente, la invención se refiere a antagonistas cíclicos de los hentetracontapéptidos de CRF así como a miembros de la familia mayor de péptidos tipo CRF, a composiciones farmacéuticas que contienen estos antagonistas de CRF cíclicos, a métodos de tratamiento de mamíferos usando estos antagonistas de CRF cíclicos y a métodos de cribado de nuevos fármacos que usan estos péptidos.

Antecedentes de la invención

- 10 Observaciones experimentales y clínicas han apoyado el concepto de que el hipotálamo representa un papel clave en la regulación de las funciones secretoras de células corticotrópicas adenohipofisarias. Hace más de 50 años se demostró que factores presentes en el hipotálamo incrementarán la velocidad de secreción de ACTH por la hipófisis cuando se incuben *in vitro* o se mantengan en un cultivo de órgano. Sin embargo, un factor liberador de corticotropina (CRF) fisiológico no se caracterizó hasta que se caracterizó el CRF ovino (oCRF) en 1981. Según se
15 divulga en la Patente de EE. UU. N° 4.415.558, se encontró que oCRF era un péptido amidado de 41 residuos. El oCRF disminuye la presión sanguínea en mamíferos cuando se inyecta periféricamente y estimula la secreción de ACTH y β -endorfina.

- 20 El CRF de rata (rCRF) se aisló, se purificó y se caracterizó más tarde; se encontró que era un hentetracontapéptido amidado homólogo según se describe en la Patente de EE. UU. N° 4.489.163. Se determinó más tarde que la secuencia de aminoácidos del CRF humano era la misma que la de rCRF. rCRF y hCRF se usan intercambiamente para describir este péptido, y frecuentemente se usa la denominación r/hCRF con respecto a esta hormona peptídica. Se considera que estas hormonas peptídicas forman parte de una familia mayor de péptidos tipo CRF naturales y análogos que incluyen los CRFs de mamífero y pez, las urotensinas y sauvagina, según se analiza en Vale y cols., "Characterization of the Hypothalamic Peptide: Corticotropin Releasing Factor",
25 *Proceedings of the Naito International Symposium on Natural and Biological Activity*, Tokio, Japón, 5-7 de noviembre de 1985, y Lederis y cols., "Neurohormones from Fish Tails, II: Actions of Urotensin I in Mammals and Fishes", *Recent Progress in Hormone Research*, Vol. 41, Academic Press, Inc. (1985).

- 30 Aunque originalmente aislado y caracterizado sobre la base de su papel en este eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal (HPA), se ha encontrado que el CRF está ampliamente distribuido a través del sistema nervioso central así como en tejidos extraneurales, tales como las glándulas suprarrenales, la placenta y los testículos, donde también puede actuar como un regulador paracrino o un neurotransmisor. Por otra parte, la implicación del CRF en trastornos afectivos, tales como ansiedad, depresión, alcoholismo y anorexia nerviosa, y en la modulación de la reproducción y respuestas inmunitarias sugiere que los cambios en la expresión de CRF pueden tener importantes consecuencias fisiológicas y patofisiológicas. Por ejemplo, las perturbaciones en los ciclos reguladores que comprenden el eje HPA producen a menudo niveles crónicamente elevados de glucocorticoides circulatorios; estos pacientes presentan los
35 distintivos físicos del síndrome de Cushing, incluyendo obesidad troncal, atrofia muscular progresiva y fertilidad reducida.

- 40 Además de su papel en la mediación de la activación del eje HPA, también se ha mostrado que el CRF modula cambios autónomos y conductuales, algunos de los cuales se producen durante la respuesta al estrés. Se ha mostrado que muchos de estos cambios conductuales se producen independientemente de la activación HPA ya que no se duplican mediante tratamiento con dexametasona y son insensibles a hipofisectomía. Además, la infusión
45 directa de CRF en el SNC imita respuestas autónomas y conductuales a una variedad de estresantes. Debido a que la administración periférica de CRF o un antagonista de CRF no afecta a ciertos de estos cambios, parece que el CRF exhibe una acción cerebral directa con respecto a estas funciones, que incluyen supresión del apetito, incremento de la excitación y capacidad de aprendizaje. Sin embargo, los antagonistas de CRF administrados periféricamente bloquean los incrementos mediados por CRF endógeno en la secreción de ACTH y, cuando estos se aportan a los ventrículos cerebrales, se pueden mitigar los cambios inducidos por estrés en la actividad autónoma y la conducta.
50

- 55 Como resultado de la amplia distribución anatómica y las múltiples acciones biológicas del CRF, se cree ahora que este péptido regulador está implicado en la regulación de numerosos procesos biológicos. El CRF también se ha relacionado con la regulación de respuestas inflamatorias. Aunque se ha observado que el CRF representa un papel proinflamatorio en ciertos modelos animales, el CRF parece suprimir la inflamación en otros modelos al reducir los incrementos inducidos por lesión en la permeabilidad vascular.

Se han desarrollado análogos de CRF que contienen isómeros D de ciertos α -aminoácidos, tales como los mostrados en la Patente de EE. UU. N° 5.278.146. El r/hCRF y el oCRF sintéticos estimulan las actividades de ACTH y tipo β -endorfina (β -END-Li) *in vitro* e *in vivo*, y disminuyen sustancialmente la presión sanguínea cuando se inyectan periféricamente. Antagonistas de estos péptidos y de sauvagina y urotensina se divulgan en la Patente de EE. UU. N° 4.605.642, expedida el 12 de agosto de 1986. Se han desarrollado antagonistas de CRF biopotentés adicionales y se divulgan en las Patentes de EE. UU. N° 5.245.009, 5.493.006, 5.510.458, 5.663.292, 5.777.073, 5.874.227 y 6.323.312.

Se han desarrollado durante los últimos 10-15 años péptidos antagonistas de CFR que exhiben una actividad biológica más duradera e incrementada, en comparación con los antagonistas de CRF previamente conocidos, y poca o sustancialmente ninguna actividad agonista de CFR residual. Muchos de estos exhiben alta afinidad a receptores.

Se ha mostrado que varios de los miembros de la familia de péptidos tipo CRF se pueden modificar para crear antagonistas de CRF muy biopotentés que se unen fuertemente a los receptores de CRF (CRF-R) conocidos, incluyendo CRFR1 y CRFR2, sin activar significativamente estos receptores y así bloquean la acción del CFR endógeno en sus receptores. Exhiben una afinidad para CRFR1 y CRFR2 superior a la exhibida por oCRF. Estas modificaciones para crear estos antagonistas de CRF bioactivos han incluido acortar N-terminalmente la molécula natural u otra de modo que tenga una longitud de 30 a 33 residuos, p. ej. r/hCRF(9-41), r/hCRF(10-41), r/hCRF(11-41) y r/hCRF(12-41), e incorporar un enlace de ciclación, preferiblemente una lactama, que liga las cadenas laterales de los residuos que están situados en las posiciones de los residuos 8° y 11° a partir del residuo C-terminal, p. ej. (ciclo 30-33)[Glu³⁰, Lys³³]r/hCRF(12-41). Se encontró que esta modificación de ciclación incrementaba a menudo muy sustancialmente la biopotencia del péptido lineal comparable. También se encontró que la combinación de este enlace de ciclación más la acilación del extremo N creaban una molécula de duración de acción prolongada y que este efecto puede ser el mayor en un péptido de 33 residuos de longitud, p. ej. (ciclo 30-33)[Ac-Asp⁹, Glu³⁰, Lys³³]-r/hCRF(9-41). Se considera que la familia de péptidos tipo CRF abarca los péptidos que se unen a los receptores de CRF y tienen al menos aproximadamente 45% de homología estructural de aminoácidos con CRF ovino, el primer CRF de mamífero aislado y caracterizado. La familia tipo CRF incluye, pero no se limita a, los siguientes péptidos conocidos: CRF ovino, CRF de rata/ser humano, CRF porcino, CRF bovino, CRFs de peces, urotensina de carpa, urotensina de matalote, urotensina de lenguado, urotensina de platija, sauvagina, las urocortinas 1, 2 y 3, y estrescopinas.

Los esfuerzos para mejorar antagonistas de CRF se han concentrado generalmente en incrementar la afinidad para uno u otro de los receptores conocidos (CRFR1 y CRFR2) o para ambos receptores (CRFR1/2) con solo un antagonista. Se ha empleado escaso esfuerzo en la optimización de las propiedades físicas/químicas para obtener análogos clínicamente seguros, potentes, estables, económicos de fabricar, es decir, la mejora de la "capacidad farmacológica" de estos análogos. Continúa la búsqueda de antagonistas de CRF que tengan una capacidad farmacológica cada vez mejor.

Sumario de la invención

Se ha identificado ahora una clase de péptidos antagonistas de CRF que se define por la siguiente fórmula general: A-D-Xaa-B-Xaa_c-Xaa_a-Xaa_b-Xaa_c-C-NH₂ en donde A es Asp-Leu-Thr o Asp-Leu-Ser o una versión acortada N-terminalmente de los mismos; D-Xaa es D-Phe, D-2Nal, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-pNO₂Phe o D-Aph(Cbm); B es una secuencia de 17 residuos de aminoácido que se encuentra entre Phe en la posición 12 y Gln en la posición 30 de r/hCRF o la secuencia correspondiente de otro péptido de la familia tipo CRF según se describe anteriormente; Xaa_c representan un par de residuos de aminoácido, cuyas cadenas laterales están conectadas en un enlace de ciclación de puente de lactama; Xaa_a es un residuo de α -aminoácido natural distinto de Cys; Xaa_b es CML, D-CML, CMV, CMP, D-Aph(Cbm) o D-Aph(Hor); y C es una secuencia de los 8 últimos residuos de aminoácido de la porción C-terminal de un péptido de la familia de CRF. El extremo N del péptido está acilado en N. También se pueden realizar sustituciones adicionales tales como las que actualmente son bien conocidas en el campo de los antagonistas de CRF en estos péptidos cíclicos modificados, p. ej. la sustitución de Met por Nle o Leu. Por otra parte, el extremo N se puede acortar al eliminar Asp o Asp-Leu o la totalidad de A (es decir des A) para proporcionar péptidos que continúan exhibiendo características antagonistas de CRF.

Según se indica anteriormente, estos péptidos tienen un enlace de ciclación entre los residuos en los que estarían las posiciones 30 y 33 en CRF de mamífero. Este enlace es preferiblemente un enlace amida (o un puente de lactama) entre grupos carboxilo y amino de la cadena lateral. Lo más preferiblemente, hay un puente de lactama entre un grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo en la posición 30, preferiblemente Glu o Asp, y un grupo amino de la cadena lateral del residuo de la posición 33, preferiblemente Lys u Orn o alternativamente Dbu, Dpr o Hly. Excepto por el hecho de que los antagonistas de CRF se están usando clínicamente con propósitos de diagnóstico del eje HPA, no se considera que los CRFs naturales, tales como CRF ovino, r/hCRF, sauvagina, urotensinas, urocortinas I, II y III y estrescopinas, tengan propiedades de tipo farmacológico en cuanto a seguridad, estabilidad química o biológica que conduzca a una duración de acción prolongada.

Estos péptidos también tienen la inclusión preferida de D-Phe, D-2Nal o D-Leu o un isómero D equivalente, p. ej., D-pNO₂Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp o D-3Pal, en la que sería la posición 12 de r/hCRF. Preferiblemente, tienen norleucina (Nle) sustituyendo a cualquier Met presente en la naturaleza, p. ej., en las que serían las posiciones 21 y 38 de r/hCRF. Se desea marcar el péptido al añadir un isótopo radiactivo o un colorante fluorescente como se conoce bien en esta técnica, D-Tyr, Tyr o un grupo acilo que tiene un resto hidroxiarilo (p. ej. des-NH₂-Tyr) se puede añadir al extremo N; también se pueden usar Ac-D-Tyr o Ac-Tyr. Cuando el extremo N se vaya a radioyodar, puede ser preferible sustituir Lys por Arg en la que sería la posición 36 de CRF ya que se considera generalmente que es el equivalente estructural que puede ser más estable. También se pueden realizar otras sustituciones opcionales a lo largo de la molécula según se enseñó previamente, y se considera que estas son equivalentes funcionales de los péptidos específicos descritos posteriormente en la presente. Por ejemplo, se encontró que análogos en los que uno de más residuos de Leu están sustituidos con un grupo metilo en el átomo de carbono α, es decir, CML, el análogo puede exhibir ciertas propiedades mejoradas. De nuevo, con respecto a la secuencia AA de r/hCRF, CML puede estar opcionalmente presente en las posiciones 10, 14, 15, 17, 18, 24, 27, 36, 37, 38, 40 y/o 41 y, de forma similar, ácido α-aminoisobutírico (Aib) o dipropilglicina (Dpg) se pueden insertar opcionalmente en una o más de las posiciones 22, 24, 28, 29, 31, 32, 34, 39, 40 y 41. Estas sustituciones pueden mejorar a menudo la biopotencia y/o incrementar la duración de acción y no se ha encontrado que tengan ningún efecto indeseable.

Según se indicó previamente, estos antagonistas de CRF mejorados se crean al acortar el extremo N de un péptido tipo CRF natural o análogo del mismo e incorporar las sustituciones deseadas. Preferiblemente, se elimina una secuencia de 8 o 9 residuos empezando en el extremo N de la molécula natural; sin embargo, se pueden eliminar 10 u 11. Por ejemplo, cuando se acorta CRF de mamífero, la molécula resultante se puede denominar según esto CRF(9-41), CRF(10-41), CRF(11-41) o CRF(12-41), dependiendo del número de residuos eliminados; los análogos más largos CRF(9-41) y CRF(10-41) con un extremo N acilado se prefieren para péptidos que exhiban una larga duración de biopotencia.

Conforme a las enseñanzas de la Patente de EE. UU. N° 5.874.227, se desarrolló un antagonista de CRF que mostraba características favorables, y se ha sometido a algunas pruebas significativas. A menudo se denomina ahora por el nombre abreviado astresina; es un péptido cíclico de 30 residuos que tiene la fórmula: ciclo(30-33)[D-Phe¹²,Nle^{21,38},Glu³⁰,Lys³³]-h/rCRF(12-41). Su secuencia de aminoácidos es:

D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Glu-Ala-His-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Ile-Ile-NH₂.

Se han desarrollado ahora antagonistas de CRF que tienen capacidad farmacológica mejorada en comparación con la astresina y con otros antagonistas de CRF desarrollados por el laboratorio de los presentes inventores. Se denominan en la presente posteriormente con nombres abreviados basados en el antagonista astresina B, en vez de en el agonista r/hCRF. La astresina B es una versión modificada de la astresina que se extiende mediante los residuos Asp-Leu-Thr en el extremo N y está sustituida por CML en las posiciones 27 y 40, que son las posiciones 19 y 32 del péptido de 33 residuos.

Ciertos de estos antagonistas de CRF mejorados formarán fibrillas durante la inyección y así exhiben formulación en depósito. Otros exhiben propiedades de solubilidad particularmente ventajosas mientras que otros exhiben potencia biológica de larga duración. En otras palabras, estos antagonistas de CRF deseables o sus sales que son menos solubles que la astresina en tampones acuosos tendrán una mayor solubilidad en aceites y viceversa.

Las composiciones farmacéuticas según la invención incluyen estos antagonistas de CRF o sales por adición atóxicas de los mismos que están dispersados en un vehículo líquido o sólido farmacéuticamente aceptable. Estas formulaciones farmacológicas se facilitan debido a que estos análogos particulares exhiben una solubilidad superior o inferior a pH fisiológico que la astresina B. Para la administración subcutánea (s.c.), se pueden preferir formulaciones en soluciones acuosas de manitol, aceite de maíz o aceite de cacahuete en las que permanece esta solubilidad alta.

La administración de estos péptidos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos a mamíferos, particularmente seres humanos, según la invención se puede llevar a cabo para la regulación de la secreción de ACTH, β-endorfina, β-lipotropina, corticosterona y otros productos del gen de pro-opiomelanocortina (POMC) y/o para afectar a funciones del estados de ánimo, conductuales y gastrointestinales y actividades del sistema nervioso autónomo. Por ejemplo, estos antagonistas de CRF se pueden administrar para reducir altos niveles de ACTH, y de ese modo tratar dolencias relacionadas con el estrés, tales como respuestas inmunitarias inducidas por estrés que afectan a la pérdida de pelo, el tracto gastrointestinal, es decir particularmente para tratar a pacientes que sufren síndrome del intestino irritable y enfermedades gastrointestinales, y también para tratar trastornos inflamatorios; supresión inmunitaria; infecciones por virus de inmunodeficiencia humana (HIV); enfermedad de Alzheimer; anorexia nerviosa; estrés hemorrágico; síndromes de abstinencia de drogas y alcohol; adicción a las drogas, psoriasis, artritis

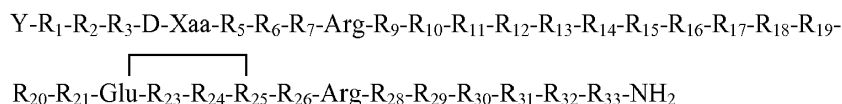
reumatoide y esterilidad. Debido a estos amplios efectos, puede ser deseable administrar estos péptidos con hormonoterapia reitutiva según se analiza posteriormente en la presente.

5 Estos péptidos también pueden proporcionar la base de métodos valiosos para el cribado de fármacos; estos pueden detectar moléculas aún más potentes que se unirán y/o activarán receptores de CRF como resultado de su alta afinidad a receptores de CRF.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

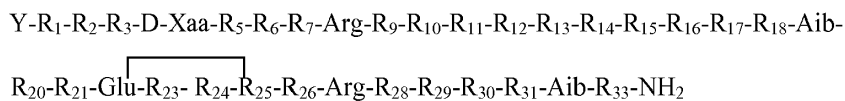
10 La nomenclatura usada para definir los péptidos es la especificada por Schroder & Lubke, "The Peptides", Academic Press (1965) en la que, según la representación convencional, el grupo amino aparece a la izquierda y el grupo carboxilo a la derecha. Las abreviaturas de 3 letras estándar se usan para identificar los residuos de alfa-aminoácido y, cuando el residuo amino tenga formas isómeras, es la forma L del aminoácido la que se representa a menos que se indique expresamente otra cosa, p. ej. Ser = L-serina, Orn = L-ornitina, Nle = L-norleucina, Nva = L-norvalina, Agl = aminoglicina, Dbu = ácido L-2,4-diaminobutírico, Dpr = ácido L-2,3-diaminopropiónico, Hly = L-homolisina y Har = L-homoarginina. Además, se usan las siguientes abreviaturas: CML = C^αCH₃-L-leucina; CMP = C^αCH₃-L-fenilalanina; CMV = C^αCH₃-L-valina; Aib = ácido 2-aminoisobutírico; Dpg = dipropilglicina; 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; Hor= L-hidroorotilo; Nic = 3-carboxipiridina (o ácido nicotínico); Cbm = carbamoilo; Acr = acrililo; Pn = propionilo; iPn = isopropionilo; Bt = butirilo; VI = valerilo; Vac = vinilacetilo; Nph = naftoilo; y Flu = fluorenoilo.

20 Estos antagonistas de CRF incluyen un isómero D en la que sería la posición 12 de r/hCRF y sería la posición 4 de astresina B (que puede estar en el extremo N, aunque el péptido preferiblemente se prolonga). Los péptidos cíclicos tienen la siguiente fórmula, o son sales atóxicas equivalentes de los mismos:



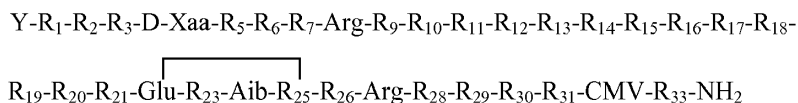
25 en donde Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene hasta de 15 a 20 átomos de carbono, preferiblemente hasta 12 átomos de carbono y más preferiblemente de 1 a 7 átomos de carbono, p. ej. Ac, For, Acr o Bz; R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; D-Xaa es D-Phe, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-pNO₂Phe, D-Nal, D-Trp, D-Aph(Cbm) o D-Pal; R₅ es His, Tyr o Glu; R₆ es CML o Leu; R₇ es Leu o CML; R₉ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₀ es Val, CML, Nle o Met; R₁₁ es Leu, CML o Ile; R₁₂ es Glu, D-Glu o His; R₁₃ es Nle, Leu, Nva o Met; R₁₄ es Ala, D-Ala, Aib, Dpg, Thr, D-Thr, Glu o D-Glu; R₁₅ es Arg, Orn o Lys; R₁₆ es Ala, Aib, Dpg o CML; R₁₇ es Glu o Asp; R₁₈ es Gln, Asn o Lys; R₁₉ es Leu, CML, Aib, Dpg, CMP o CMV; R₂₀ es Ala, Dpg, o Aib; R₂₁ es Gln, Aib, Dpg o Glu; R₂₃ es Ala, Dpg o Aib; R₂₄ es Aib, Dpg, CML, D-CML, D-Aph(Cbm) o D-Aph(Hor); R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Asn, Aib, Dpg, CML o D-CML; R₂₈ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₂₉ es CML, Leu o Tyr; R₃₀ es Nle, CML o Met; R₃₁ es Glu, Aib, Dpg o Asp; R₃₂ es CMP, CMV, CML, Ile, Aib, Dpg, Thr, Asn, Glu, Ala, Val, Leu, Nle, Phe, Nva, Gly o Gln; y R₃₃ es Ala, Aib, Dpg, Ile, Gly, Val, Leu, CML, Nle, Phe, Nva o Gln; con la condición de que R¹⁹ sea Aib, Dpg, CMP o CMV o que R²⁴ sea CML, D-CML, CMV, CMP, D-Aph(Cbm) o D-Aph(Hor). Como una alternativa a esta acilación opcional en el extremo N, se puede formar una sulfonamida, o se puede añadir un azúcar o un lípido para modular la hidrofilia y por lo tanto la duración de acción y la solubilidad. Por des-R₁ se entiende que se elimina el residuo que estaría en esa posición.

40 Otro grupo más de antagonistas de CRF preferidos tiene la siguiente fórmula (incluyendo sales atóxicas de los mismos):



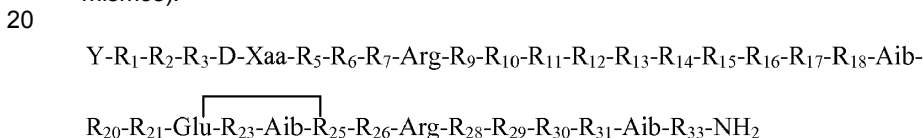
45 en donde Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene hasta 15 átomos de carbono, preferiblemente hasta 12 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 7 átomos de carbono, p. ej. Ac, For, Acr o Bz; R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; D-Xaa es D-Phe, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-Nal, D-Trp o D-Pal; R₅ es His, Tyr o Glu; R₆ es CML o Leu; R₇ es Leu o CML; R₉ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₀ es Val, CML, Nle o Met; R₁₁ es Leu, CML o Ile; R₁₂ es Glu, D-Glu o His; R₁₃ es Nle o Met; R₁₄ es Ala, D-Ala, Aib, Thr, D-Thr, Glu o D-Glu; R₁₅ es Arg, Orn o Lys; R₁₆ es Ala, Aib o CML; R₁₇ es Glu o Asp; R₁₈ es Gln, Asn o Lys; R₂₀ es Ala o Aib; R₂₁ es Gln, Aib o Glu; R₂₃ es Ala o Aib; R₂₄ es His, Aib, D-Aph(Cbm) o CML; R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Asn o Aib; R₂₈ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₂₉ es CML, Leu o Tyr; R₃₀ es Nle, CML o Met; R₃₁ es Glu, Aib o Asp; y R₃₃ es Ala, Aib, Ile, Gly, Val, Leu, CML, Nle, Phe, Nva o Gln.

55 Otro grupo preferido de antagonistas de CRF tiene la siguiente fórmula (incluyendo sales atóxicas de los mismos):



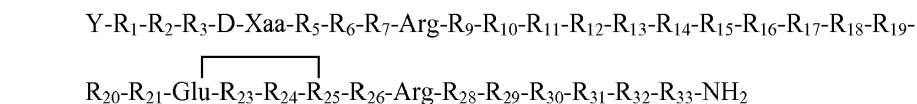
5 en donde Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene hasta 15 átomos de carbono, preferiblemente hasta 12 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 7 átomos de carbono, p. ej. Ac, For, Acr o Bz; R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; D-Xaa es D-Phe, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-Nal, D-Trp o D-Pal; R₅ es His, Tyr o Glu; R₆ es CML o Leu; R₇ es Leu o CML; R₉ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₀ es Val, CML, Nle o Met; R₁₁ es Leu, CML o Ile; R₁₂ es Glu, D-Glu o His; R₁₃ es Nle o Met; R₁₄ es Ala, D-Ala, Aib, Thr, D-Thr, Glu o D-Glu; R₁₅ es Arg, Orn o Lys; R₁₆ es Ala, Aib o CML; R₁₇ es Glu o Asp; R₁₈ es Gln, Asn o Lys; R₁₉ es CMV o Aib; R₂₀ es Ala o Aib; R₂₁ es Gln, Aib o Glu; R₂₃ es Ala o Aib; R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Asn o Aib; R₂₈ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₂₉ es CML, Leu o Tyr; R₃₀ es Nle, CML o Met; R₃₁ es Glu, Aib o Asp; y R₃₃ es Ala, Aib, Ile, Gly, Val, Leu, CML, Nle, Phe, Nva o Gln. Cuando se desee que el péptido se asemeje mucho a r/hCRF, se incorporan todas o la mayoría de las selecciones siguientes: R₁₀ es Val, R₁₄ es Ala, R₁₅ es Arg, R₁₆ es Ala, R₁₇ es Glu, R₂₀ es Ala, R₃₁ es Glu y R₃₃ es Ile.

15 Otro grupo preferido más de antagonistas se basa en las secuencias de r/hCRF y oCRF y, debido a las síntesis que se han llevado a cabo a lo largo de la última década, se ha observado uniformemente que cualquiera de los residuos en la posición correspondiente en el CRF ovino se puede sustituir en la secuencia de aminoácidos de r/hCRF sin alterar significativamente su biopotencia. Este grupo tiene la siguiente fórmula (incluyendo sales atóxicas de los mismos):



25 en donde Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene hasta 15 átomos de carbono, preferiblemente hasta 12 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 7 átomos de carbono, p. ej. Ac, For, Acr o Bz; R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; D-Xaa es D-Phe, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-Nal, D-Trp o D-Pal; R₅ es His, Tyr o Glu; R₆ es CML o Leu; R₇ es Leu o CML; R₉ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₀ es Val, CML, Nle o Met; R₁₁ es Leu, CML o Ile; R₁₂ es Glu, D-Glu o His; R₁₃ es Nle o Met; R₁₄ es Ala, D-Ala, Aib, Thr, D-Thr, Glu o D-Glu; R₁₅ es Arg, Orn o Lys; R₁₆ es Ala, Aib o CML; R₁₇ es Glu o Asp; R₁₈ es Gln, Asn o Lys; R₂₀ es Ala o Aib; R₂₁ es Gln, Aib o Glu; R₂₃ es Ala o Aib; R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Asn o Aib; R₂₈ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₂₉ es CML, Leu o Tyr; R₃₀ es Nle, CML o Met; R₃₁ es Glu, Aib o Asp; y R₃₃ es Ala, Aib, Ile, Gly, Val, Leu, CML, Nle, Phe, Nva o Gln.

30 Un grupo adicional de antagonistas de CRF tiene la fórmula (incluyendo sales atóxicas de los mismos):



35 en donde Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene hasta 15 átomos de carbono, preferiblemente hasta 12 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 7 átomos de carbono, p. ej. Ac, For, Acr o Bz; R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; D-Xaa es D-Phe, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-Nal, D-Trp o D-Pal; R₅ es His, Tyr o Glu; R₆ es CML o Leu; R₇ es Leu o CML; R₉ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₀ es Val, CML, Nle o Met; R₁₁ es Leu, CML o Ile; R₁₂ es Glu, D-Glu o His; R₁₃ es Nle o Met; R₁₄ es Ala, D-Ala, Aib, Thr, D-Thr, Glu o D-Glu; R₁₅ es Arg, Orn o Lys; R₁₆ es Ala, Aib o CML; R₁₇ es Glu o Asp; R₁₈ es Gln, Asn o Lys; R₁₉ es Leu o CML; R₂₀ es Ala o Aib; R₂₁ es Gln, Aib o Glu; R₂₃ es Ala o Aib; R₂₄ es D-Aph(Cbm), CML, D-CML o D-Aph(Hor); R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Asn o Aib; R₂₈ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₂₉ es CML, Leu o Tyr; R₃₀ es Nle, CML o Met; R₃₁ es Glu, Aib o Asp; R₃₂ es CML, Ile, Aib, Thr, Asn, Glu, Ala, Val, Leu, Nle, Phe, Nva, Gly o Gln; y R₃₃ es Ala, Aib, Ile, Gly, Val, Leu, CML, Nle, Phe, Nva o Gln. Análogos específicos de este grupo que se considera que son particularmente biopotentes desde de punto de vista de reducir altos niveles de ACTH y cortisol son:

40 [D-Aph(Cbm)²⁴]-Astresina B;

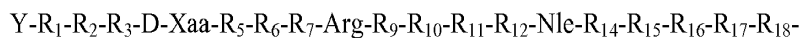
50 [CML²⁴]-Astresina B;

[D-CML²⁴]-Astresina B; y

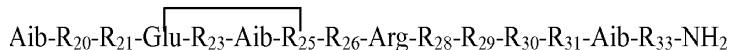
55 [D-Aph(Hor)²⁴]-Astresina B.

Cuando Tyr o D-Tyr está presente en el extremo N, el péptido se puede radiomarcarse convenientemente usando ¹²⁵I.

Un grupo preferido adicional más de antagonistas de CRF tiene la fórmula (incluyendo sales atóxicas de los mismos):



5



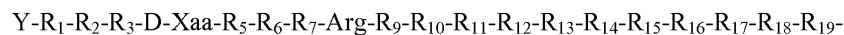
en donde Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene hasta 15 átomos de carbono, preferiblemente hasta 12 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 7 átomos de carbono, p. ej. Ac, For, Acr o Bz; R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; D-Xaa es D-Phe, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-Nal, D-Trp o D-Pal; R₅ es His, Tyr o Glu; R₆ es CML o Leu; R₇ es Leu o CML; R₉ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₀ es Val, CML o Nle; R₁₁ es Leu, CML o Ile; R₁₂ es Glu o His; R₁₄ es Ala, Aib, Thr, o Glu; R₁₅ es Arg, Orn o Lys; R₁₆ es Ala, Aib o CML; R₁₇ es Glu o Asp; R₁₈ es Gln, Asn o Lys; R₂₀ es Ala o Aib; R₂₁ es Gln, Aib o Glu; R₂₃ es Ala o Aib; R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Aib, CML o D-CML; R₂₈ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₂₉ es CML, Leu o Tyr; R₃₀ es Nle o CML; R₃₁ es Glu, Aib o Asp; y R₃₃ es Ala, Aib, Ile, Gly, Val, Leu, CML, Nle, Phe, Nva o Gln. Un análogo de este grupo que se considera que es particularmente biopotente desde el punto de vista de reducir altos niveles de ACTH es [Aib^{19,24,32}]-Astresina B.

10

15

Un grupo preferido adicional más de antagonistas de CRF tiene la fórmula (incluyendo sales atóxicas de los mismos):

20



en donde Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene hasta 15 átomos de carbono, preferiblemente hasta 12 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 7 átomos de carbono, p. ej. Ac, For, Acr o Bz; R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; D-Xaa es D-Phe, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-Nal, D-Trp o D-Pal; R₅ es His, Tyr o Glu; R₆ es CML o Leu; R₇ es Leu o CML; R₉ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₀ es Val, CML, Nle o Met; R₁₁ es Leu, CML o Ile; R₁₂ es Glu, D-Glu o His; R₁₃ es Nle o Met; R₁₄ es Ala, D-Ala, Aib, Thr, D-Thr, Glu o D-Glu; R₁₅ es Arg, Orn o Lys; R₁₆ es Ala, Aib o CML; R₁₇ es Glu o Asp; R₁₈ es Gln, Asn o Lys; R₁₉ es Aib, CMV o CMP; R₂₀ es Ala o Aib; R₂₁ es Gln, Aib o Glu; R₂₃ es Ala o Aib; R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Asn o Aib; R₂₈ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₂₉ es CML, Leu o Tyr; R₃₀ es Nle, CML o Met; R₃₁ es Glu, Aib o Asp; R₃₂ es Aib, CMP o CMV; y R₃₃ es Ala, Aib, Ile, Gly, Val, Leu, CML, Nle, Phe, Nva o Gln. Análogos específicos de este grupo que se considera que son particularmente biopotentes desde de punto de vista de reducir altos niveles de ACTH y cortisol son:

25

30

[CMP¹⁹, Aib^{24,32}]-Astresina B;

35

[CMP^{19,32}, Aib²⁴]-Astresina B;

[Aib^{19,24}, CMP³²]-Astresina B;

40

[CMV^{19,32}, Aib²⁴]-Astresina B; y

[Aib^{19,24}, CMV³²]-Astresina B.

45

Los péptidos se sintetizan mediante un método adecuado, tal como mediante técnicas exclusivamente en fase sólida, mediante condensación de fragmentos o mediante adición en solución clásica. Por ejemplo, se puede emplear el método de síntesis divulgado con detalle en la Patente de EE. UU. N° 5.777.073.

50

Común a las síntesis químicas de péptidos es la protección de los grupos lábiles de la cadena lateral de los diversos restos de aminoácido con grupos protectores adecuados que evitarán que se produzca una reacción química en ese sitio hasta que el grupo se retire definitivamente. Habitualmente, también es común la protección de un grupo amino alfa en un aminoácido o un fragmento mientras esa entidad reacciona en el grupo carboxilo, seguida por la retirada selectiva del grupo protector de amino alfa para permitir que tenga lugar la reacción posterior en esa localización. Según esto, es común que, como una etapa de la síntesis, se produzca un compuesto intermedio que incluya cada uno de los residuos de aminoácido situados en su secuencia deseada en la cadena peptídica, teniendo varios de los

55

Por ejemplo, la síntesis química de un análogo peptídico a partir de un grupo preferido puede incluir la formación inicial de un producto intermedio de la siguiente secuencia de aminoácidos: X¹-Asp(X⁵)-Leu-Thr(X²)-D-Phe-R₅(X⁷ o X⁵)-Leu-Leu-Arg(X³)-R₉(X⁵)-R₁₀-Leu-R₁₂(X⁵ o X⁸)-Nle-R₁₄(X² o X⁵)-R₁₅(X³, X⁶ o X⁸)-R₁₆-R₁₇(X⁵)-R₁₈(X⁴ o X⁶)-R₁₉-R₂₀-R₂₁(X⁴ o X⁵)-R₂₂(X⁵ o X⁸)-R₂₃-R₂₄(X³ or X⁷)-R₂₅(X⁶ o X⁸)-R₂₆(X⁴)-Arg(X³)-R₂₈(X³ or X⁶)-R₂₉(X⁷)-Nle-R₃₁(X⁵)-R₃₂(X², X⁴ o X⁶)-R₃₃(X⁴)-X⁹ en donde: los grupos R son como se definieron anteriormente en la presente.

60

5 X^1 bien es hidrógeno o bien un grupo protector de amino alfa. Los grupos protectores de amino alfa contemplados por X^1 son los que se sabe que son útiles en la técnica en la síntesis por etapas de polipéptidos. Entre las clases de grupos protectores de amino alfa cubiertas por X^1 están (1) grupos protectores de tipo acilo, tales como formilo (For), acrililo (Acr), benzoílo (Bz) y acetilo (Ac) que se usan preferiblemente solamente en el extremo N; (2) grupos protectores de tipo uretano aromático, tales como benciloxicarbonilo (Z) y Z sustituido, tales como p-clorobenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo; (3) grupos protectores uretano alifático, tales como t-butiloxicarbonilo (BOC), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, aliloxicarbonilo; (4) grupos protectores de tipo cicloalquiluretano, tales como fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo y ciclohexiloxicarbonilo; y (5) grupos protectores de tipo tiouretano, tales como feniltiocarbonilo. Los dos grupos protectores de amino alfa preferidos son BOC y Fmoc.

15 X^2 es un grupo protector para el grupo hidroxilo de Thr o Ser y se selecciona preferiblemente de la clase que consiste en acetilo (Ac), terc-butilo, trifenilmetio (trítulo), tetrahidropiranilo, éter bencilico (Bzl) y 2,6-diclorobencilo (DCB). El grupo protector más preferido es Bzl. X^2 puede ser hidrógeno, lo que significa que no hay grupo protector en el grupo hidroxilo.

20 X^3 es a grupo protector para el grupo guanidino de Arg o Har seleccionado preferiblemente de la clase que consiste en nitro, p-toluenosulfonilo (Tos), Z, adamantiloxicarbonilo y BOC, o es hidrógeno. Tos es el más preferido para la estrategia de BOC.

X^4 es hidrógeno o un grupo protector, preferiblemente xantilo (Xan), para el grupo amido de Asn o Gln. A menudo, Asn o Gln está acoplado sin protección de la cadena lateral en presencia de hidroxibenzotriazol (HOBT).

25 X^5 es hidrógeno o un grupo protector formador de éster para el grupo β - o γ -carboxilo de Asp o Glu, preferiblemente seleccionado de los ésteres de ciclohexilo (OChx) bencilo (OBzl), 2,6-diclorobencilo, metilo, etilo y t-butilo (Ot-Bu). Se prefiere OChx para una estrategia de BOC.

30 X^6 es hidrógeno o un grupo protector para el sustituyente amino de la cadena lateral de Lys u Orn. Ilustrativos de grupos protectores de amino de la cadena lateral adecuados son Z, 2-clorobenciloxicarbonilo (2Cl-Z), Tos, t-amiloxicarbonilo (Aoc), BOC y grupos protectores de tipo uretano aromático o alifático según se especifica anteriormente en la presente. Se prefiere 2Cl-Z para una estrategia de BOC.

35 Cuando esté presente His, X^7 es hidrógeno o un grupo protector para el nitrógeno del imidazol tal como Tos o 2,4-dinitrofenilo (DNP), y cuando esté presente Tyr, X^7 es hidrógeno o un grupo protector para el grupo hidroxilo tal como DCB. Cuando esté presente Met, el azufre puede estar protegido, si se desea, con oxígeno.

40 La selección de un grupo protector de amino de la cadena lateral no es crítica excepto que debe ser uno que no se retire durante la desprotección de los grupos amino alfa durante la síntesis. De ahí que el grupo protector de amino alfa y el grupo protector de amino de la cadena lateral no puedan ser iguales.

X^9 es NH_2 , un grupo protector, tal como un éster, o un enlace de anclaje usado en la síntesis en fase sólida para conectar a un soporte de resina sólida, preferiblemente uno de los siguientes:

- 45
- soporte de resina de NH-benzhidrilamina (BHA) y
 - soporte de resina de NH-parametilbenzhidrilamina (MBHA).

50 La escisión desde una resina de BHA o MBHA da directamente la amida análoga de CRF. Al emplear un derivado metilado de esta resina, se puede crear una amida sustituida con metilo, que se considera que es un equivalente de la amida no sustituida.

55 En la secuencia de aminoácidos para el producto intermedio, al menos uno de X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 y X^7 es un grupo protector o X^9 incluye soporte de resina. El aminoácido particular elegido para cada grupo R determina si también habrá un grupo protector ligado como se especifica anteriormente en la presente y según se conoce generalmente en la técnica. Al seleccionar un grupo protector de la cadena lateral particular que se va a usar en la síntesis de los péptidos, se siguen las siguientes reglas: (a) el grupo protector debe ser estable al reactivo y bajo las condiciones de reacción seleccionadas para retirar el grupo protector de amino alfa en cada etapa de la síntesis, (b) el grupo protector debe retener sus propiedades protectoras y no separarse bajo condiciones de acoplamiento y (c) el grupo protector de la cadena lateral debe ser retirable, al finalizar la síntesis que contiene la secuencia de aminoácidos deseada, bajo condiciones de reacción que no alteren la cadena peptídica.

60 Para el extremo N acilado, está presente un grupo acilo que tiene 15 átomos de carbono o menos, preferiblemente 12 o menos, según se representa por Y; acetilo (Ac), formilo (For), acrililo (Acr) y benzoílo (Bz) propionilo, butiróilo, valeroílo, hexanoílo, octanoílo, decanoílo, tetradecanoílo son los grupos acilo preferidos, aunque, para facilitar el

marcaje, se puede usar un agente acilante que contiene un resto hidroxiarilo, tal como ácido 4-hidroxi-fenilpropiónico (des-NH₂-Tyr) o ácido 4-hidroxi-fenilacético. Además, Y puede ser alternativamente un azúcar o lípido adecuado, que son equivalentes que se pueden usar para ajustar la hidrofiliía.

5 Los péptidos de la invención se pueden sintetizar mediante síntesis de péptidos en solución clásica, y esta síntesis se puede preferir para grandes cantidades. Para obtener cantidades limitadas, p. ej. menos de 1 kg, puede ser preferible prepararlos usando síntesis en fase sólida, tal como la descrita por Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, p 2149 (1964), que facilita que los péptidos antagonistas de CRF se preparen de un modo sencillo y a continuación se prueben rápidamente para determinar la actividad biológica. Esto facilita la preparación y evaluación rápidas de
10 diversos péptidos antagonistas de CRF. La síntesis en fase sólida se comienza a partir del extremo C del péptido al acoplar un alfa-aminoácido protegido a una resina adecuada según se indica generalmente en la Patente de EE. UU. N° 4.244.946 expedida el 21 de enero de 1981 a favor de Rivier y cols. Esta materia prima para un antagonista basado en CRF humano se puede preparar al ligar Ile protegida en el amino alfa a una resina de MBHA.

15 Ile (R33) protegida por BOC se acopla a la resina de MBHA usando un reactivo de acoplamiento en cloruro de metileno y/o dimetilformamida (DMF) y/o N-metilpirrolidona (NMP). Después del acoplamiento de BOC-Ile al soporte de resina, el grupo protector de amino alfa se retira, tal como al usar ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metileno, TFA solo o con HCl en dioxano. Preferiblemente, se usa TFA al 50% en volumen en cloruro de metileno con 0-5% en peso de 1,2-etanoditiol o m-cresol. La desprotección se lleva a cabo a una temperatura entre
20 aproximadamente 0°C y 70°C. Se pueden usar otros reactivos y condiciones de escisión estándar para la retirada de grupos protectores de amino alfa específicos, según se describe en Schroder & Lubke, "The Peptides", Vol. 1, 72-75 (Academic Press 1965) y en el bien conocido texto de Barany-Merrifield.

25 Después de la retirada del grupo protector de amino alfa de Ile, los restantes aminoácidos con el amino alfa y la cadena lateral protegidos se acoplan por etapas en el orden deseado para obtener un compuesto intermedio tal como se definió anteriormente en la presente memoria. Como una alternativa a añadir cada aminoácido separadamente en la síntesis, algunos de ellos se pueden acoplar entre sí en fase acuosa antes de la adición al reactor en fase sólida.

30 La activación o el acoplamiento de reactivos para el uso en la síntesis en fase sólida de los péptidos son muy conocidos en la técnica de los péptidos. Ejemplos de estos reactivos son carbodiimidias adecuadas, tales como N,N'-diisopropilcarbodiimida, (DIC) N,N'-diciohexilcarbodiimida (DCC) y N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Otros reactivos activadores y su uso en el acoplamiento de péptidos son descritos por Schroder & Lubke, anteriormente, en el Capítulo III y por Kapoor, *J. Phar. Sci.*, 59, pp 1-27 (1970). También se puede usar éster p-nitrofenílico (ONp) para activar el extremo carboxilo de Asn o Gln para el acoplamiento. Por ejemplo, BOC-Asn(ONp)
35 se puede acoplar durante la noche usando un equivalente de HOBt en una mezcla al 50% de DMF y cloruro de metileno.

40 Otros reactivos de acoplamiento más recientes incluyen HBTU, TBTU, HATU, BOP y PyBop entre otros.

45 Cada aminoácido o secuencia de aminoácidos protegidos se introduce en el reactor en fase sólida en un exceso de aproximadamente tres veces, y el acoplamiento se lleva a cabo en un medio de dimetilformamida (DMF):CH₂Cl₂ (1:1) o en CH₂Cl₂ solo a temperatura ambiente. Alternativamente, el acoplamiento se puede llevar a cabo a una temperatura elevada de hasta aproximadamente 70°C en NMP o en una mezcla de tolueno:DMSO (70:30) o en DMF en un sintetizador de microondas. En los casos en los que el acoplamiento se lleva a cabo manualmente, el éxito de la reacción de acoplamiento en cada paso de la síntesis se comprueba mediante la reacción de la ninhidrina, según se describe por E. Kaiser y cols., *Anal. Biochem.* 34, 595 (1970). En los casos en los que se produce un acoplamiento incompleto, el procedimiento de acoplamiento se repite antes de la retirada del grupo protector de amino alfa antes del acoplamiento del siguiente aminoácido. Las reacciones de acoplamiento se pueden realizar automáticamente, tal como en un sintetizador automático CSBio Modelo 356, usando un programa tal como el presentado en Rivier y cols., *Biopolymers*, 17, pp.1927-1938, (1978).

50 Después de que se haya completado la secuencia de aminoácidos deseada, el péptido intermedio se retira del soporte de resina a menos que se desee formar el enlace de ciclación mientras está ligado a la resina, según se describe posteriormente en la presente. La retirada se efectúa mediante el tratamiento con un reactivo, tal como fluoruro de hidrógeno (HF) líquido, que no solo escinde el péptido de la resina sino que también escinde todos los grupos protectores de la cadena lateral restantes X², X³, X⁴, X⁵, X⁶ y X⁷ y el grupo protector de amino alfa X¹, si todavía está presente (a menos que sea un grupo acilo que está destinado a estar presente en el péptido final), para obtener el péptido. Cuando se use fluoruro de hidrógeno para la escisión, se incluyen anisol o cresol y sulfuro de metiletilo en el recipiente de reacción como eliminadores. Cuando esté presente Met en la secuencia, el grupo protector BOC se puede escindir con ácido trifluoroacético (TFA)/etanoditiol antes de escindir el péptido de la resina para eliminar la S-alkilación potencial.

65 Para efectuar una conexión de ciclación (puente de lactama), la ciclación se puede llevar a cabo mientras el péptido parcialmente protegido permanezca ligado a la resina según se divulga en las Patentes de EE. UU. N° 5.064.939 y 5.043.322. Este procedimiento crea eficazmente un enlace de ciclación amida entre las dos cadenas laterales

deseadas mientras otros residuos, tales como Asp, Glu y/o Lys, del producto intermedio peptídico retienen su protección de la cadena lateral.

5 Cuando se cicla a través de un enlace amida entre un grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo de la posición 22 de astresina B y un grupo amino de la cadena lateral del residuo de la posición 25, es preferible sintetizar el péptido protegido sobre una resina de MBHA o BHA y derivar el éster bencílico de la cadena lateral de ácido carboxílico particular hasta la hidrazida mientras el péptido todavía está ligado a la resina y a continuación hacerla reaccionar con una cadena lateral de amino protegida selectivamente según se indica en la Patente de EE. UU. N° 5.043.322. Preferiblemente, la ciclación se efectúa al usar un grupo protector lábil para las bases, p. ej., OFm, para la cadena lateral carboxílica del residuo que va a estar implicado en el puente por enlace amida, y usar Fmoc como un grupo protector para la cadena lateral amínica en el otro residuo que va a estar implicado. El grupo protector de amino α en el residuo en el extremo N del producto intermedio y todos los otros grupos protectores de la cadena lateral permanecen en su lugar mientras los dos grupos lábiles para las bases se retiran usando piperidina o similares. Después de esta retirada selectiva, se lleva a cabo una reacción para conseguir la ciclación al tratar con reactivo PyBOP y base de DIPEA que efectúa una generación sustancialmente completa del enlace amida. Después de la ciclación, el péptido se desprotege completamente y se escinde de la resina usando un reactivo, tal como HF. Opcionalmente, un grupo protector BOC se retira en primer lugar del extremo N usando TFA, particularmente si el extremo N se va a acilar.

20 Alternativamente, las ciclaciones de péptidos al crear estas conexiones amida también se pueden efectuar usando las enseñanzas de las Patentes de EE. UU. N° 4.115.554 (19 de septiembre de 1978), 4.133.805 (9 de enero de 1979), 4.140.767 (20 de febrero de 1979), 4.161.521 (17 de julio de 1979), 4.191.754 (4 de marzo de 1980), 4.238.481 (9 de diciembre de 1980), 4.244.947 (13 de enero de 1981) y 4.261.885 (14 de abril de 1981).

25 Se puede llevar a cabo un ensayo *in vitro* sencillo usando células de adenohipófisis de rata en cultivo en monocapa para determinar qué actividad de CRF exhibirá un posible péptido; el procedimiento que se usa es el que se indica generalmente en *Endocrinology*, 91, 562 (1972). El ensayo mostrará si un posible péptido exhibe alguna actividad como un agonista de CRF y estimula la secreción de ACTH al activar reactores de CRF en estas células; de este modo, su actividad de CRF intrínseca se mide a través del uso de altas dosis. Esencialmente, se emplea el mismo ensayo *in vitro* para determinar si el candidato exhibe fuertes propiedades antagonistas de CRF cuando se administre junto con una dosis estimulante de CRF, habitualmente bien oCRF o bien r/hCRF.

35 Un posible péptido antagonista de CRF también se evalúa fácilmente en un ensayo de unión usando un receptor de CRF conocido, tal como se describe en Perrin, M., y cols., *Endocrinology*, 118, 1171-1179 (1986). Los detalles de los ensayos de unión se analizan más tarde en esta memoria descriptiva y se pueden llevar a cabo con CRF-R humano. Radioligandos tales como (ciclo 30-33)[¹²⁵I-D-Tyr¹², Glu³⁰, Lys³³, Nle^{21,38}]-r/hCRF(12-41) y su análogo que tiene D-His³² tienen alta afinidad para CRF-R humano. Por ejemplo, el compuesto nombrado en primer lugar tiene una K_D de 2,0 nanomolar (1,4-2,9) para la unión a hCRF-R1, que es esencialmente igual a la del análogo de D-Phe¹² comparable. Uno de estos ensayos de unión representativos que utiliza receptor CRF-R se describe en Chen, y cols., *P.N.A.S.*, 90, 8967-8971 (octubre de 1993). Debido a que ciertos de estos péptidos cíclicos exhiben alta afinidad de unión para todos los receptores de CRF conocidos, son especialmente valiosos para el uso en ensayos de cribado. Estos ensayos se usan ventajosamente para cribar ligandos tipo CRF potenciales, en forma peptídica u otra, usando tal antagonista de CFR cíclico marcado con alta afinidad.

45 El siguiente Ejemplo I indica un método preferido para sintetizar antagonistas de CRF mediante la técnica en fase sólida con la estrategia de BOC.

Ejemplo I

50 La síntesis de [D-Aph(Cbm)²⁴]-Astresina B que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Lcu-Arg-Glu-Val-Lcu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Glu-Ala-D-Aph(Cbm)-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-

Ile-NH₂

se efectúa en una

55 **Síntesis por etapas de ciclo(30-33) [DPhe¹²,Nle^{21,38},Leu(Me)^{27,40},Glu³⁰,DAph(Cbm)³²,Lys³³]Ac-hCRF(9-41); [DAph(Cbm)²⁴]astresina B**

Se sintetizó mediante metodología en fase sólida por etapas sobre una resina de MBHA usando la estrategia de BOC con protección ortogonal (Fmoc y OFm) de las cadenas laterales de los residuos que se van a ciclar. Los derivados de aminoácidos Boc-Ala-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Asn(Xan)-OH, Boc-Asp(cHex)-OH, Boc-Gln(Xan)-

OH, Boc-Glu(cHex)-OH, Boc-His(Dnp)-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Nle-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Tyr(2-Br-Cbz)-OH y Boc-Val-OH se obtuvieron de Bachem Inc. (Torrance, CA), Chem-Impex International (Wood Dale, IL), Novabiochem (San Diego, CA), Reanal (Budapest, Hungría) y AAPtec (Louisville, Ky). Boc-Leu(Me)-OH, {Hernández, 1993 #1970} Boc-DAPh(Cbm)-OH {Jiang, 2001 #2828} se sintetizaron como se describe previamente. Todos los disolventes eran de calidad para reactivo o mejores. El sintetizador de péptidos era el producto de CSBio (Modelo 356). Se usó TFA que contenía 1% de *m*-cresol para retirar el grupo Boc. DIC/HOBt mediaban en el ensamblaje de la cadena principal. Se usó 1,6 mM (exceso de cuatro veces) de aminoácido protegido basándose en la sustitución original de la resina de MBHA (0,4 mM/g). El tiempo de acoplamiento era 60 min pero se aplicó un reacoplamiento de Boc-Glu(cHex)-OH y Boc-Gln(Xan)-OH después de los residuos 32 (CML) y 19 (CML), respectivamente. La acetilación del extremo N se llevó a cabo después de la finalización de la secuencia con exceso de anhídrido acético en DCM durante 15 min. El grupo protector DNP de la cadena lateral de la histidina se escindió con tiofenol al 20% en NMP durante 3 horas. La desprotección del grupo Fmoc de la cadena lateral del residuo 33 (Lys) y el grupo OFm de la cadena lateral del residuo 30 (Glu) se alcanzó usando simultáneamente una solución de piperidina al 20%/NMP (2 x 10 min) seguido por lavados secuenciales con NMP, MeOH, TEA al 10%/DCM y DCM. La formación de lactama se mediaba usando PyBop y DIPEA en NMP durante varias horas a temperatura ambiente hasta que mostraba una prueba de ninhidrina negativa.

El péptido se escindió y se desprotegió mediante HF anhidro en presencia de anisol (5-10% v/v) a 0°C durante 90 min. El péptido en bruto se precipitó y se lavó con éter dietílico anhidro, se filtró, se extrajo de la resina con una solución de TFA al 0,1% en CH₃CN/H₂O (60:40) y se liofilizó. El péptido se purificó usando RP-HPLC y tres sistemas disolventes (TEAP a pH 2,25, TEAP a pH 6,5 y TFA al 0,1%, sucesivamente). Se usó un gradiente lineal de 0,3% de B por incrementos de 1 min desde el % de B de referencia (Eluyente A = TEAP a pH 2,25, eluyente B = 60% de CH₃CN, 40% de A) en la primera etapa de purificación, seguido por una segunda etapa de purificación usando un gradiente lineal de 1% de B por incrementos de 1 min desde el % de B de referencia (Eluyente A = TEAP a pH 6,5, eluyente B = 60% de CH₃CN, 40% de A).

El péptido se desaló usando el tercer paso de purificación mediante un gradiente lineal de 1% de B por incrementos de 1 min desde el % de B de referencia (Eluyente A = TFA al 0,1%, eluyente B = 60% de CH₃CN, 40% de A). Las fracciones de cada pase se probaron mediante RP-HPLC analítica usando condiciones isocráticas (45% de CH₃CN/55% de H₂O que contiene TFA al 0,1%) en una columna Grace Vydac C₁₈. Después de la etapa de purificación final, las fracciones de buena calidad se reunieron y se liofilizaron. La pureza del péptido se determinó con electroforesis zonal capilar (CZE) usando un sistema Beckman P/ACE 2050 controlado por un IBM Personal System/2 modelo 50Z y usando un integrador ChromJet. Intensidad de campo de 15 kV a 30°C, fase móvil: fosfato sódico 100 mM (85:15, H₂O:CH₃CN) pH 2,50, en un capilar Supelco P175 (363 µm de diámetro externo x 75 µm de diámetro interno x 50 cm de longitud). Tenía una pureza de 85%. La pureza mediante HPLC analítica era 78% (RT = 25,87 min). Se realizó RP-HPLC usando un GE Healthcare AKTApurifier 10 y una columna Phenomenex Kinetex XB-C18 (4,6 x 100 mm, 2,6 µm de tamaño de partícula, 100 Å de tamaño de poro). El sistema disolvente estaba comprendido por eluyente A = TEAP 0,015 M, pH 6,5, eluyente B = 60% de CH₃CN, 40% de A. Se realizó un gradiente desde 50% de B hasta 90% de B en 40 min (mantenido a 90% de B), a un caudal de 1,2 ml/min. La detección era a 214 nm. El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 4030,17 Da, que coincide con el valor calculado de 4029,28 Da.

La biopotencia *in vitro* del péptido obtenido como producto se puede medir como sigue. Las adenohipófisis de rata procedentes de ratas Sprague-Dawley macho se disociaron mediante colagenasa y se sembraron (0,16x10⁶ células/pocillo en placas de 48 pocillos) en medio que contenía 2% de suero bovino fetal (FBS). Tres días después de la siembra, las células se lavan tres veces con medio reciente que contiene 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA) y se incuban durante 1 hora. Después de 1 hora de preincubación, las células se lavan una vez más y los péptidos de prueba se aplican en presencia de oCFR 1 nM. Al final de un período de incubación de 3 horas, los medios se recogen y se determina el nivel de ACTH mediante radioinmunoensayo (Diagnostic Products Corporation).

La administración del péptido inhibe la secreción de inmunoadtividades de ACTH y tipo β-endorfina (β-END-LI) y exhibe una duración de inhibición especialmente larga. Los ensayos *in vivo* que se emplean para probar estos antagonistas de CRF usan ratas suprarrenalectomizadas (ADX). Ratas Sprague Dawley macho adultas (230-250 g) se suprarrenalectomizan a través de un enfoque de Lombar bajo anestesia con halotano. Su dieta se complementa con NaCl al 0,9% en el agua de bebida y con naranjas. Dos días antes de los experimentos, los animales se equipan con una cánula yugular, según se describe en C. Rivier, y cols., *Endocrinology*, 110, 272-278 (1982). En la mañana de los experimentos, las cánulas *i.v.* se conectan a un conducto relleno con solución salina heparinizada y las ratas se colocan en cubos individuales y se dejan sin perturbar durante 2 horas. Para el experimento, se extrae una primera muestra de sangre de 0,3 ml, la solución de prueba se inyecta (en un volumen de 0,2-0,5 ml) y se obtienen muestras de sangre posteriores aproximadamente a los 15, 45, 90 y 120 minutos. Las muestras de sangre se centrifugan y el plasma separado se mantiene congelado (-20°C) hasta que se ensaya con respecto a los valores de ACTH. Los niveles plasmáticos de ACTH se miden según se describe en C. Rivier, y cols. *J. Neuroscience*, 14, 1985 (1994).

65

Como resultado de la prueba *in vivo* a un nivel de 1 mg/kg de peso corporal, se muestra que, en un tiempo de 15 minutos, el antagonista de CRF cíclico es más eficaz que el antagonista de CRF estándar para reducir los niveles de ACTH en el suero. A los 45 minutos después de la inyección, el compuesto cíclico disminuye los niveles de ACTH aún más que al nivel a los 15 minutos, mientras el efecto del antagonista de CRF estándar ha seguido su curso y los niveles son sustancialmente iguales que en los animales de control. A los 90 minutos, los niveles de ACTH permanecen aproximadamente a este nivel bajo para las ratas tratadas con el compuesto cíclico, muy por debajo del nivel de las ratas de control y las tratadas con el antagonista de CRF estándar. A los 120 minutos después de la inyección, el nivel de ACTH vuelve esencialmente a la normalidad. Cuando se prueba a niveles de 0,3 mg/kg de peso corporal, los resultados son esencialmente los mismos para 15 y 45 minutos; sin embargo, a los 90 minutos, todavía hay alguna mejora sobre las ratas tratadas con el antagonista de CRF estándar pero no es tan significativa como la mostrada cuando se inyecta a un nivel de 1 miligramo por kg de peso corporal.

Se lleva a cabo una serie adicional de pruebas en las que las ratas son inyectadas con el antagonista de CRF estándar a un nivel de 3 mg/kg y 2 grupos de otras ratas son inyectados con los antagonistas de CRF cíclicos a niveles de 0,1 mg/kg y 0,03 mg/kg. Los resultados son esencialmente los mismos que en las dos pruebas previas a los 15 y 45 minutos, mostrando incluso la inyección de 0,03 mg/kg una mejora sobre la inyección de 3 mg/kg del antagonista de CRF estándar. A los 90 minutos, hay una mejora adicional sobre las ratas inyectadas con los 3 mg/kg del estándar; sin embargo, los niveles de ACTH vuelven esencialmente aproximadamente a los niveles al principio de la prueba tras el paso de 90 minutos. Las pruebas muestran que, incluso cuando se use a un nivel 1/100 de la cantidad del antagonista de CRF estándar, el compuesto cíclico todavía se comporta sustancialmente mejor a lo largo de un espacio de tiempo de 45 minutos. Colectivamente, estos datos muestran que el péptido cíclico es de acción prolongada. Con la administración subcutánea (s.c.) *in vivo*, es de acción sustancialmente más prolongada que la astresina B.

El péptido también se ha evaluado en un ensayo de unión. Se midieron las afinidades de unión (K_i , nM) del péptido a membranas celulares que expresan bien CRFR1 o bien CRFR2 en presencia de un estándar. Los valores se derivaban de ensayos de desplazamiento competitivo de radioligandos que usan el agonista marcado con ^{125}I no selectivo [Tyr⁰,Glu¹,Nle¹⁷]-sauvagina como el radioligando y fracciones de membrana en bruto procedentes de células COSM6 que expresan transitoriamente los respectivos receptores. Brevemente, se combinaron 200.000 cpm (alrededor de 0,5 nM) de ^{125}I -[Tyr⁰,Glu¹Nle¹⁷]-sauvagina con concentraciones crecientes de péptido (inicialmente diluido a 10 mg/ml en DMSO) de 0,1 a 1000 nM en 0,2 ml de tampón de ensayo (50 mM de Na HEPES, pH 7,5; 10 mM de MgCl₂; 2 mM de EGTA; 0,1% de BSA) y se incubaron durante 90 min a 20 °C. Las reacciones se realizaron en placas Multi-Screen de 96 pocillos (Millipore, Bedford, MA) con filtros GF/C. La unión se terminó mediante aspiración a través de la placa, seguido por un lavado de 0,2 ml con tampón de ensayo. Todos los ensayos contenían tubos para la unión inespecífica, lo que se consideró que eran los recuentos por minuto que quedaban en presencia de 100 a 200 nM de ligando no marcado. $K_{0.5}$ y sus límites de confianza al 95% se determinaron al reunir datos procedentes de al menos tres ensayos independientes usando el programa informático LIGAND. [Munson PJ y Rodbard D (1980) Ligand: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107:220-239]. El producto peptídico cíclico de la síntesis descrita anteriormente exhibe una biopotencia aproximadamente 1,3 veces mayor para CRFR1 y aproximadamente 3 veces mayor para CRFR2 que la del presente péptido "estándar", es decir, astresina B.

Ejemplo I A

La síntesis de Ejemplo I se repite usando una partida triple pero acortando el péptido en el extremo N. 1/3 de la cantidad original de resina se retira después de la adición de D-Phe y a continuación después de la adición de Thr; la síntesis se termina después de la adición de Leu. Después de la escisión, se producen los tres péptidos siguientes:

[D-Aph(Cbm)²⁴] astresina B (2-33);

[D-Aph(Cbm)²⁴] astresina B (3-33); y

[D-Aph(Cbm)²⁴] astresina B (4-33).

La biopotencia de cada péptido se mide *in vitro*, según se describe previamente, en comparación con el péptido estándar de laboratorio, es decir, astresina B. Generalmente, los resultados son comparables al péptido del Ejemplo I pero muestran ligeramente menos biopotencia.

Ejemplo II

La síntesis del Ejemplo I se repite, sustituyendo D-Aph(Cbm) por CML, para producir el siguiente péptido:

[CML²⁴]-Astresina B. Tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Glu-Ala-CML-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂

5 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3951,33 Da, que coincide con el valor calculado de 3951,29 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 77%, según se confirma mediante CZE y 90% según se confirma mediante HPLC (RT = 27,04 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es aproximadamente igual que el presente patrón de laboratorio, es decir, astresina B, sobre CRFR1 y dos veces más potente sobre CRFR2.

EJEMPLO II A

La síntesis del Ejemplo II se repite, sustituyendo CML por D-CML, para producir el siguiente péptido:

[D-CML²⁴]-Astresina B. Tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

10 Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Glu-Ala-D-CML-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂

El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3951,59 Da, que coincide con el valor calculado de 3951,29 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 75% según se confirma mediante CZE y 84% según se confirma mediante HPLC (RT = 28,14 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es aproximadamente igual que la del patrón de laboratorio, es decir, astresina B.

15 **EJEMPLO II B**

La síntesis de Ejemplo II se repite, sustituyendo CML por D-Aph(Hor), para producir el siguiente péptido:

[D-Aph(Hor)²⁴]-Astresina B. Tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

20 Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Glu-Ala-D-Aph(Hor)-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂.

La biopotencia del péptido es aproximadamente igual a la del patrón de laboratorio, es decir, astresina B.

20 **Ejemplo III**

La síntesis de [CMP¹⁹, Aib^{24,32}]-Astresina B que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

25 Arg-Ala-Glu-Gln-CMP-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂

se efectúa como se describe en el Ejemplo I anteriormente, excepto que el residuo 19 es CMP en lugar de CML y los residuos 24 y 32 son Aib en lugar de D-Aph(Cbm) y CML.

30 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3901,08 Da, que coincide con el valor calculado de 3901,18 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 99%, confirmada adicionalmente mediante CZE y 94% mediante HPLC (RT = 23,57 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es aproximadamente igual que la del patrón de laboratorio, es decir, astresina B.

Ejemplo III A

La general síntesis de Ejemplo I se usa para producir el siguiente péptido: [CMP^{19,32}, Aib²⁴]-Astresina B que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-CMP-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CMP-Ile-NH₂.

- 5 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3977,76 Da, que coincide con el valor calculado de 3977,21 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 95% según se confirma mediante CZE y 77% mediante HPLC (RT = 26,92 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es aproximadamente la mitad que la del péptido estándar, astresina B, sobre CRFR1 e igual sobre CRFR2.

Ejemplo III AA

- 10 La general síntesis de Ejemplo I se usa para producir el siguiente péptido: [CMP¹⁹, Aib²⁴]-Astresina B que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-CMP-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂.

La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es mayor que la del péptido estándar, astresina B.

- 15 **Ejemplo III B**

La general síntesis de Ejemplo I se usa para producir el siguiente péptido: [Aib^{19,24}, CMP³²]-Astresina B que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CMP-Ile-NH₂.

- 20 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3901,18 Da, que coincide con el valor calculado de 3901,18 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 84% según se confirma mediante CZE y 80% mediante HPLC (RT = 24,18 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es aproximadamente tres veces menos potente sobre CRFR1 y 1,3 veces más potente que la del péptido estándar, astresina B.

Ejemplo III C

- 25 La general síntesis de Ejemplo I se usa para producir el siguiente péptido: [CMV^{19,32}, Aib²⁴]-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-CMV-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CMV-Ile-NH₂.

- 30 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3881,19 Da, que coincide con el valor calculado de 3881,22 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 95% según se confirma mediante CZE y 91% mediante HPLC (RT = 23,82 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es aproximadamente dos veces menos potente sobre CRFR1 y 10 veces más potente sobre CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.

Ejemplo III D

La general síntesis de Ejemplo I se usa para producir el siguiente péptido: [Aib^{19,24}, CMV³²]-Astresina-B que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CMV-Ile-NH₂.

- 5 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3853,05 Da, que coincide con el valor calculado de 3853,18 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 97% según se confirma mediante CZE y 90% mediante HPLC (RT = 22,06 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es aproximadamente la mitad en CRFR1 y tres veces en CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.

Ejemplo III E

- 10 La general síntesis de Ejemplo I se usa para producir el siguiente péptido: [Aib^{19,24,32}]-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂.

- 15 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3824,98 Da, que coincide con el valor calculado de 3825,15 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 96% según se confirma mediante CZE y 98% mediante HPLC (RT = 19,95 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es aproximadamente cuatro veces menos potente en CRFR1 y cuatro veces más potente en CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.

- 20 Varios de los péptidos procedentes de estos ejemplos se prueban con respecto a la solubilidad y en un ensayo de unión. El estudio de solubilidad se lleva a cabo en DMSO (20%) y D-manitol al 5% en agua (80%) con la concentración de péptido de 10 mg/ml. Los resultados se indican en la Tabla 1 posteriormente.

Tabla 1

Péptido del Ejemplo	Solubilidad			Afinidad de Unión	
	5 min	2 h	24 h	CRFR1	CRFR2
IIIE	Sol.	Sol.	Sol.	1,17 (0,882-1,56)	0,32 (0,173-0,60)
IIID	Sol.	Sol.	Sol.	0,7 (0,4-1,3)	0,39 (0,29-0,52)
IIIC	Sol.	Gel	Gel	0,68 (0,36-1,29)	0,13 (0,021-0,84)
II	Sol.	Sol.	Sol.	0,32 (0,20-0,51)	0,60 (0,60-0,90)
IIA	Sol.	Sol.	Sol.	0,3 (0,07-1,1)	0,46 (0,27-0,79)
III	Sol.	Sol.	Sol.	0,49 (0,23-1,06)	0,86 (0,66-1,1)
IIIA	Insol.	Insol.	Insol.	0,79 (0,24-2,60)	1,23 (1-1,5)
IIIB	Sol.	Sol.	Sol.	0,91 (0,18-4,7)	0,89 (0,50-1,6)
I	Sol.	Sol.	Sol.	0,22 (0,15-0,33)	0,44 (0,253-0,76)

Nota: Los estudios de afinidad de unión se llevaron a cabo usando un trazador de sauvagina.

Ejemplo III EA

- 25 La síntesis general del Ejemplo III E se repite con un cambio. La acilación del extremo N se llevó a cabo, después de la finalización de la secuencia, usando un exceso molar de >100 veces de ácido propiónico en CH₂Cl₂ con activación con DIC durante 15 minutos. Se produce el siguiente péptido: [Aib^{19,24,32}]-Propionil-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

Propionil-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂.

El análisis por MS del producto muestra una masa $[M+H]^+$ de 3839,19 Da, que coincide con el valor calculado de 3839,14 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 99% según se confirma mediante CZE y 96% mediante HPLC (RT = 17,12 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es la mitad de potente en CRFR1 y cuatro veces mejor en CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.

Ejemplo III EB

La síntesis general del Ejemplo III E se repite con un cambio. La acilación del extremo N se llevó a cabo, después de la finalización de la secuencia, usando un exceso de anhídrido butírico en CH₂Cl₂ durante 15 minutos. Se produce el siguiente péptido: [Aib^{19,24,32}]-Butirolil-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

Butirolil-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂.

El análisis por MS del producto muestra una masa $[M+H]^+$ de 3853,02 Da, que coincide con el valor calculado de 3853,14 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 94% según se confirma mediante CZE y 96% mediante HPLC (RT = 18,60 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es la mitad de potente sobre CRFR1 y cuatro veces mejor sobre CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.

Ejemplo III EC

La síntesis general de Ejemplo III E se repite con un cambio. La acilación del extremo N se llevó a cabo, después de la finalización de la secuencia, usando un exceso de ácido valérico en CH₂Cl₂ con activación por DIC durante 15 minutos. Se produce el siguiente péptido: [Aib^{19,24,32}]-Valeroil-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

Valeroil-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂.

El análisis por MS del producto muestra una masa $[M+H]^+$ de 3867,20 Da, que coincide con el valor calculado de 3867,14 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 98% según se confirma mediante CZE y 95% mediante HPLC (RT = 20,36 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es la mitad de potente que en CRFR1 y cuatro veces mejor en CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.

Ejemplo III ED

La síntesis general de Ejemplo III E se repite con un cambio. La acilación del extremo N se llevó a cabo, después de la finalización de la secuencia, usando un exceso de ácido hexanoico en CH₂Cl₂ con activación por DIC durante 15 minutos. Se produce el siguiente péptido: [Aib^{19,24,32}]-Hexanoil-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

Hexanoil-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂.

El análisis por MS del producto muestra una masa $[M+H]^+$ de 3881,89 Da, que coincide con el valor calculado de 3881,20 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 99% según se confirma mediante CZE y 84% mediante HPLC (RT = 22,54 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es la mitad de potente para CRFR1 y cuatro veces más potentes en CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.

Ejemplo III EE

La síntesis general de Ejemplo III E se repite con un cambio. La acilación del extremo N se llevó a cabo, después de la finalización de la secuencia, usando un exceso de ácido decanoico en CH₂Cl₂ con activación por DIC durante 15 minutos. Se produce el siguiente péptido: [Aib^{19,24,32}]-Decanoil-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

Decanoil-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂.

- 5 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3937,10 Da, que coincide con el valor calculado de 3937,89 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 91% según se confirma mediante CZE y 88% mediante HPLC (RT = 31,17 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es la mitad de potente en CRFR1 y cuatro veces más potente en CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.

Ejemplo III EF

- 10 La síntesis general de Ejemplo III E se repite con un cambio. La acilación del extremo N se llevó a cabo, después de la finalización de la secuencia, usando un exceso de ácido tetradecanoico en CH₂Cl₂ con activación por DIC durante 15 minutos. Se produce el siguiente péptido: [Aib^{19,24,32}]-Tetradecanoil-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

Tetradecanoil-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂.

- 15 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 3994,29 Da, que coincide con el valor calculado de 3993,89 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 96% según se confirma mediante CZE y 92% mediante HPLC (RT = 41,83 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es 2,5 veces menos potente en CRFR1 y dos veces menos potente en CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.

Ejemplo III EG

- 20 La síntesis general de Ejemplo III E se repite con un cambio. La acilación del extremo N se llevó a cabo, después de la finalización de la secuencia, usando un exceso de ácido 21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaohexaheneicosanoico en CH₂Cl₂ con activación por DIC durante 15 minutos. Se producía el siguiente péptido: [Aib^{19,24,32}] 21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaohexaheneicosanoil-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaohexaheneicosanoil-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-

Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

┌──────────┐
Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂.

- 25 El análisis por MS del producto muestra una masa [M+H]⁺ de 4118,55 Da, que coincide con el valor calculado de 4117,38 Da. Tiene una pureza de aproximadamente 88% según se confirma mediante CZE y 84% mediante HPLC (RT = 14,66 min). La biopotencia del péptido, determinada como se describe previamente, es diez veces menos potente en CRFR1 y ligeramente menos potente sobre CRFR2 que la del péptido estándar, astresina B.
- 30 Varios de los péptidos procedentes de estos ejemplos se prueban con respecto a la solubilidad y en un ensayo de unión. El estudio de solubilidad se lleva a cabo en DMSO (20%) y D-manitol al 5% en agua (80%) con la concentración de péptido de 10 mg/ml. Los resultados se indican en la Tabla 2 posteriormente.

Tabla 2

Péptido del Ejemplo	Solubilidad			Afinidad de Unión	
	2 min	5 min	2 h	CRFR1	CRFR2
III EA	Sol.	Sol.	Sol.	0,69 (0,57-0,83)	0,36 (0,32-0,41)
III EB	Ligeramente Sol.	Sol.	Sol.	0,74 (0,58-0,94)	0,35 (0,28-0,43)

Péptido del Ejemplo	Solubilidad			Afinidad de Unión	
	2 min	5 min	2 h	CRFR1	CRFR2
III EC	Ligeramente Sol.	Ligeramente Sol.	Sol.	0,67 (0,50-0,89)	0,32 (0,27-0,39)
III ED	Insol.	Insol.	Sol.	0,56 (0,37-0,85)	0,35 (0,29-0,42)
III EE	Insol.	Insol.	Ligeramente Sol.	0,47 (0,17-1,29)	0,39 (0,31-0,49)
III EF	Insol.	Insol.	Insol.	0,81 (0,60-1,10)	2,16 (1,91-2,45)
III EG	Muy Sol.	Muy Sol.	Muy Sol.	3,4 (2,36-3,82)	1,71* (1,12-2,59)

Nota: Los estudios de Afinidad de Unión se llevaron a cabo usando un trazador de sauvagina.

***Este estudio de Afinidad de Unión se llevó a cabo usando un trazador de astresina.**

5 **Ejemplo IV**

La síntesis de Ejemplo II se repite, pero alargando el extremo N al añadir Tyr para producir el siguiente péptido:

[Tyr-Asp¹, Aib^{19,24,32}]-Astresina B, que tiene la secuencia de aminoácidos:

Tyr-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

10 Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂.

La administración del péptido inhibe la secreción de ACTH y β-END-LI. El péptido se radiomarca fácilmente usando ¹²⁵I.

Ejemplo V

15 La síntesis de [Aib^{19,24,32}, Orn²⁵]-Astresina B que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Orn-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂

se efectúa como se describe en el Ejemplo III E anteriormente, excepto que el residuo 25 es Orn en lugar de Lys.

20 La administración de cada uno de los antagonistas peptídicos inhibe la secreción de ACTH y corticosterona.

Ejemplo VI A

Se sintetiza un péptido de 33 residuos basado en la secuencia de aminoácidos de urotensina de carpa I(9-41) que tiene la formula:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Asn-Nle-Ile-Glu-Nle-Ala-Arg-

25 Asn-Glu-Asn-Aib-Arg-Glu-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Tyr-Leu-Asp-Aib-Val-NH₂.

La prueba según el procedimiento general indicado en el Ejemplo I muestra que el compuesto cíclico inhibe la secreción de ACTH y corticosterona.

Ejemplo VI B

30 Se sintetiza un péptido de 33 residuos basado en la secuencia de aminoácidos de sauvagina(8-40) que tiene la formula:

Ac-Asp-Leu-Ser-D-Leu-Glu-Leu-Leu-Arg-Lys-Nle-Ile-Glu-Ile-Glu-

Lys-Gln-Glu-Lys-Aib-Lys-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Leu-Leu-Leu-Asp-Aib-Ile-NH₂

La prueba según el procedimiento general indicado en el Ejemplo I muestra que el compuesto cíclico inhibe la secreción de ACTH y corticosterona.

Ejemplo VI C

- 5 Un péptido de 33 residuos basado en la secuencia de aminoácidos de CRF(9-41) ovino que tiene la formula:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Thr-

Lys-Ala-Asp-Gln-Aib-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Asp-Aib-Ala-NH₂

La prueba según el procedimiento general indicado en el Ejemplo I muestra que el compuesto cíclico inhibe la secreción de ACTH y corticosterona.

Ejemplo VI D

- 10 Se sintetiza un péptido de 33 residuos basado en la secuencia de aminoácidos de urotensina de matalote I(9-41) que tiene la formula:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Asn-Nle-Ile-Glu-Nle-Ala-Arg-Ile-Glu-Asn-Aib-

Arg-Glu-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Tyr-Leu-Asp-Aib-Val-NH₂

- 15 El péptido tiene biopotencia para inhibir la secreción de ACTH y corticosterona.

Ejemplo VII

Usando el procedimiento como el indicado generalmente en el Ejemplo I, también se prepararon los siguientes péptidos antagonistas de CRF:

20 [Dpg^{19,24,32}]-Astresina B

[Aph(Cbm)²⁴]-Astresina B

25 [Aib^{19,26}]-Astresina B

[Dpg^{19,24}]-Astresina B

[Aib^{19,24}]-Astresina B

30 [Nle¹⁰, D-CMP¹⁹, Aib²⁴]-Astresina B

[D-CMP¹⁹, Aib²⁴, CML²⁸]-Astresina B

35 [CML¹¹, D-CMP¹⁹, Aib²⁴]-Astresina B

[Asp¹⁷, D-CMP¹⁹, Aib²⁴]-Astresina B

[Lys¹⁵, D-CMP¹⁹, Aib²⁴]-Astresina B

40 [CMV¹⁹, Aib²⁴]-Astresina B

[CMV¹⁹, Aib²⁴, CML²⁹]-Astresina B

45 [CMV¹⁹, Aib²⁴]-Astresina B

[Nle¹⁰, CMV¹⁹, Aib²⁴]-Astresina B

[CMV¹⁹, Aib^{24,26}]-Astresina B

5 [CML⁶, Aib^{19,24,32}]-Astresina B

[Aib^{14,19,24,32}]-Astresina B

10 [Nle¹⁰, Aib^{19,24,32}]-Astresina B

[CML¹¹, Aib^{19,24,32}]-Astresina B

[His¹³, Aib^{19,24,32}]-Astresina B

15 [Aib^{19,24,32}, CML²⁸]-Astresina B

[Aib^{19,21,24}, CMP³²]-Astresina B

20 [Aib^{19,24,26}, CMP³²]-Astresina B

[Lys¹⁵, Aib^{19,24}, CMP³², CML²⁹]-Astresina B

[Aib^{19,24,31}, CMP³²]-Astresina B

25 [Aib^{19,24}, CMP³², CML²⁸]-Astresina B

Estos péptidos son biopotentes para inhibir la secreción de ACTH y corticosterona en respuesta a diversos estímulos, y se unen a CRFR1 y CRFR2.

30 Preferiblemente, el antagonista de CRF cíclico no activa inherentemente el receptor de CRF. Por ejemplo, el Péptido I del Ejemplo I solamente tiene aproximadamente 3% o menos de actividad de CRF intrínseca cuando se administra a la dosis más alta. Generalmente, se considera que un péptido no activa significativamente el receptor de CRF cuando su actividad intrínseca mide aproximadamente 20% o menos del compuesto natural. Los antagonistas preferidos tienen una actividad intrínseca de aproximadamente 15% o menos; sin embargo, la actividad intrínseca es simplemente un factor que se va a equilibrar frente a la potencia de un péptido como un antagonista.

El CRF estimula profundamente el eje hipófiso-suprarrenal-cortical y los antagonistas de CRF son útiles para inhibir las funciones de este eje en ciertos tipos de pacientes que experimentan alta producción de ACTH y glucocorticoides endógenos. Por ejemplo, los antagonistas de CRF pueden ser útiles para regular la función hipófiso-suprarrenal en pacientes que tienen enfermedad de Cushing hipofisaria o cualquier tumor que soporte CRF-R. Los miembros preferidos de los antagonistas de CRF mejorados proporcionados por la invención se unen con alta afinidad a receptores de CRF sin activar significativamente los receptores, es decir exhiben una actividad intrínseca o un agonismo menor de 15% que el de CRF ovino. Por otra parte, se considera que tienen un efecto cuando se administran periféricamente, p. ej. i.v., s.c., intranasalmente, intrapulmonarmente, etc., y se pueden usar para combatir trastornos estomacales inducidos por estrés que resultan en parte de la secreción de ácidos.

Se ha encontrado que la mayoría de otros péptidos reguladores tienen efectos sobre el sistema endocrino, el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal. Debido a que la secreción de ACTH y β -END-LI es la condición indispensable de la respuesta de los mamíferos al estrés, no es sorprendente que el CRF tenga efectos significativos sobre el cerebro como un mediador de muchas de las respuestas del cuerpo al estrés. Según esto, los antagonistas de CRF aportados al cerebro también deben encontrar aplicación en la modificación del estado de ánimo, el aprendizaje y la conducta, p. ej. adicción a las drogas y abstinencia de drogas y alcohol, de individuos normales y mentalmente enfermos. Además, los antagonistas de CRF en el cerebro deben mejorar las condiciones inducidas por estrés a las que podría contribuir el CRF endógeno, incluyendo algunos tipos de hipertensión, anorexia nerviosa, estrés hemorrágico, esterilidad, disminución de la libido, impotencia e hiperglucemia. Debido a que los antagonistas de CRF administrados periféricamente reducen los niveles de ACTH, β -END, β -lipotropina, otros productos génicos de pro-opiomelanocortina y corticosterona, la administración de los antagonistas se puede usar para reducir los efectos de todas estas sustancias sobre el cerebro para influir de ese modo en la memoria, el estado de ánimo, la apreciación del dolor, etc., y más específicamente, vigilia, depresión y/o ansiedad, así como modular el sistema inmunitario, el tracto gastrointestinal y el crecimiento y la función corticosuprarrenal. También se pueden usar para tratar infecciones por VIH y enfermedad de Alzheimer.

Debido a que los antagonistas de CRF bloquearán el eje hipotálamo-hipofisario (HPA) y por lo tanto bloquean la secreción de ACTH y corticosterona en los casos en los que los efectos deseados de la administración pueden ser sobre otras funciones (p. ej. inmunitaria, neuronal, etc.), la hormonoterapia reconstitutiva (es decir la administración de ACTH y/o corticosterona) puede ser aconsejable como un adyuvante a la terapia con antagonistas de CRF, según

sea necesario para mantener la homeostasia. Como un ejemplo paralelo, la restitución de testosterona se usa a menudo cuando se tratan seres humanos normales con antagonistas de GnRH para la anticoncepción masculina a fin de retener la libido. Esta hormonoterapia restitutiva no está indicada en el caso del cáncer de próstata.

5 Se ha mostrado que todos los péptidos relacionados con CRF dilatan el lecho vascular mesentérico. Los antagonistas de CRF también se deben usar para disminuir el flujo sanguíneo al tracto gastrointestinal de mamíferos, particularmente seres humanos. Además, debido a que el CRF influye en la producción de ácidos gástricos, los antagonistas de CRF también deben ser eficaces para modular las funciones gastrointestinales, incluyendo síndrome abdominal-intestinal y enfermedades inflamatorias.

10 Los antagonistas de CRF o las sales por adición atóxicas de los mismos, combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica, se pueden administrar a mamíferos, incluyendo seres humanos, bien intravenosamente, bien subcutáneamente, bien intramuscularmente, bien intrapleurariamente, bien percutáneamente, p. ej. intranasalmente, intracerebroventricularmente, o bien oralmente.

15 Los péptidos deben tener una pureza de al menos aproximadamente 90% y preferiblemente deben tener una pureza de al menos aproximadamente 98%; sin embargo, purezas inferiores son eficaces y se pueden usar bien con mamíferos diferentes a seres humanos. Esta pureza significa que el péptido en cuestión constituye el % en peso indicado de todos los péptidos y fragmentos peptídicos similares presentes. La administración a seres humanos puede ser empleada por un médico para inhibir la producción de glucocorticoides endógenos o para posibles usos esbozados anteriormente. La administración puede ser en una variedad de formas de dosificación tales como comprimidos, pastillas para chupar, polvos, jarabes, soluciones inyectables, formulaciones de depósito inyectables y similares. La dosificación requerida variará con la afección particular que se trate, con la gravedad de la afección y con la duración del tratamiento deseado, y se pueden usar múltiples dosificaciones para un solo día. A fin de bloquear los efectos relacionados con el estrés de CRF endógeno dentro del sistema nervioso central, puede ser necesario aportar los antagonistas de CRF al ventrículo cerebral o el fluido espinal. Alternativamente, se debe encontrar un medio para modificar los antagonistas de modo que puedan penetrar en la barrera hematoencefálica. Para la administración parental, se pueden emplear soluciones en aceite de cacahuete, en propilenglicol acuoso o en solución acuosa estéril; los medios acuosos estériles están fácilmente disponibles. Estas soluciones acuosas, que están adecuadamente tamponadas, son especialmente adecuadas para la administración intravenosa (i.v.),

20 intramuscular, subcutánea (s.c.) e intraperitoneal. Para la administración s.c., se puede preferir aceite de maíz o una solución de manitol al 3-6%. Estos péptidos a menudo se administran en la forma de sales atóxicas farmacéuticamente aceptables, tales como sales por adición de ácido o complejos metálicos, p. ej., con cinc, hierro, calcio, bario, magnesio, aluminio o similares (que se consideran sales por adición para los propósitos de esta solicitud). Ilustrativas de estas sales por adición de ácido son hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, cinamato, sulfato, sulfamato, sulfonato, fosfato, tanato, oxalato, fumarato, gluconato, alginato, maleato, acetato, trifluoroacetato, citrato, benzoato, succinato, pamoato, malato, ascorbato, tartrato y similares, que se pueden preparar de un modo convencional. Se pueden preferir las sales de ácido trifluoroacético y ácido pamoico. Si el ingrediente activo se va a administrar en forma de comprimido, el comprimido puede contener un aglutinante o excipiente, tal como tragacanto, almidón de maíz o gelatina; un agente desintegrante, tal como ácido algínico; y un lubricante, tal como estearato magnésico. Si se desea la administración en forma líquida, se puede usar un edulcorante y/o saborizante, y se puede efectuar la administración intravenosa en solución salina isotónica, soluciones tamponadoras de fosfato o similares.

25 También puede ser deseable aportar el péptido antagonista de CRF a lo largo de períodos prolongados, por ejemplo, durante períodos de una semana o considerablemente más largos, a partir de una sola administración, y se pueden utilizar formas de dosificación de liberación lenta, depósito o implante. Por ejemplo, una formulación de depósito de liberación lenta adecuada para inyección puede contener el antagonista de CRF o una sal del mismo dispersados o encapsulados en un polímero atóxico o no antigénico de degradación lenta tal como un polímero de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico), por ejemplo, como el descrito en la Patente de EE. UU. N° 3.773.919.

30 Los péptidos se deben administrar bajo las directrices de un médico en dosis simples o múltiples, y las composiciones farmacéuticas contendrán habitualmente el péptido junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable conocido que puede prolongar su duración de acción. La dosificación eficaz depende generalmente de la vía de administración pretendida y otros factores tales como la edad y el peso del paciente, como es conocido generalmente por un médico, y también de la dolencia que se trate. Habitualmente, la dosificación será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 miligramos del péptido por kilogramo del peso corporal del animal receptor. Para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, se emplea generalmente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg; para enfermedades gastrointestinales de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg, así como para anorexia nerviosa, estrés hemorrágico, tratamiento de síntomas de abstinencia de drogas y alcohol y tratamiento de problemas de fertilidad. La dosificación diaria se puede administrar en una sola dosis o hasta tres dosis divididas.

35 Según se menciona anteriormente en la presente, se han clonado ahora receptores de CRF y se divulgan en el susodicho artículo de Chen y cols. en Perrin, M., y cols., *P.N.A.S.*, 92, 2969-2973 (marzo de 1995) y en Lovenberg, T., y cols., *P.N.A.S.*, 92, 836-840 (enero de 1995). Afinidad de unión es un término usado para referirse a la fuerza de la interacción entre ligando y receptor. Para demostrar la afinidad de unión para un receptor de CRF, los péptidos

de la invención se evalúan fácilmente usando un ligando trazador de afinidad conocida, tal como oCRF o [D-Tyr¹², Nle^{21,38}]-r/hCRF(12-41) radiomarcados con ¹²⁵I, en experimentos de ensayos de unión que son muy conocidos en esta técnica. Los resultados de estos ensayos indican la afinidad a la que cada ligando se une a un receptor de CRF, expresada en cuanto a K_i, una constante de afinidad de unión inhibitoria relativa a este estándar conocido. La K_i (constante de afinidad de unión inhibitoria) se determina usando un ligando radiactivo "estándar" o "trazador" y así mide el desplazamiento del trazador desde el receptor o la proteína de unión; lo más apropiadamente, se expresa con referencia a este trazador. Sin embargo, con la condición de que estos ensayos se realicen cuidadosamente bajo condiciones específicas con concentraciones relativamente bajas de receptor o similares, la K_i calculada será sustancialmente igual que su constante de disociación K_D. La constante de disociación K_D es representativa de la concentración de ligando necesaria para ocupar la mitad (50%) de los sitios de unión de un receptor o similares. Es particularmente eficaz para probar K_i debido a que solamente se necesita marcar, p. ej. radioyodar, un único trazador. Un ligando dado que tiene una alta afinidad de unión para un receptor de CRF requerirá la presencia de muy poco ligando para unirse a al menos 50% de los sitios de unión disponibles de modo que el valor de K_D para ese ligando y receptor será un número pequeño. Por otra parte, un ligando dado que tenga una baja afinidad de unión para un receptor de CFR particular requerirá la presencia de un nivel relativamente alto del ligando para unirse a 50% de los sitios, de modo que el valor de K_D para ese ligando y receptor será un número grande.

Con respecto a la proteína receptora particular, un péptido análogo de CRF que tiene una K_D de aproximadamente 10 nM o menos significa que se requerirá una concentración del ligando (es decir, el péptido análogo de CRF) de no más de aproximadamente 10 nM para ocupar al menos 50% de los sitios de unión activos de la proteína receptora. Estos valores se pueden determinar claramente a partir de los resultados obtenidos usando un estándar radiyodado y no más de aproximadamente 0,8 nM del receptor (aproximadamente 10-20 pmol de receptor/mg de proteína membranaria). 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 menos a fin de ocupar (o unirse a) al menos 50% de los sitios de unión del receptor, y se considera que estos tienen una alta afinidad. Algunos de estos péptidos análogos de CRF tienen una afinidad de unión de aproximadamente 2 nM o menos. Generalmente, para los propósitos de esta solicitud, se considera que una constante de disociación de aproximadamente 5 nanomolar o inferior es una indicación de afinidad fuerte, y una K_D de aproximadamente 2 nanomolar o menos es una indicación de afinidad muy fuerte. Por ejemplo, el péptido cíclico del Ejemplo I C se une a CRF-RA con una afinidad muy fuerte, teniendo una K_D = aproximadamente 2,0 nanomolar. También se considera que es particularmente ventajoso que algunos de los péptidos análogos de CRF tengan una afinidad sustancialmente superior para una de las dos familias de receptores de CRF-RA y CRF-RB de modo que sean así selectivos en su efecto biológico.

Estos ensayos de unión que emplean receptores de CRF son sencillos de realizar y se pueden llevar a cabo fácilmente con péptidos inicialmente identificados o sintetizados para determinar si es probable que estos péptidos sean antagonistas de CRF eficaces. Generalmente, los péptidos antagonistas de CRF eficaces exhibirán no más de aproximadamente 25% de actividad intrínseca en pruebas *in vitro*, y habitualmente no más de aproximadamente 5%, p. ej. no estimularán la secreción de ACTH en un nivel mayor de aproximadamente 25% de una concentración molar similar de CRF(1-41) ovino. Sin embargo, este criterio no se considera crítico, ya que la experiencia ha mostrado que esta actividad agonista intrínseca muy a menudo no se traduce en efectos *in vivo* y así puede ser aceptable. Estos ensayos de unión se pueden llevar a cabo de una variedad de modos como es bien conocido para el experto en la técnica. Un ejemplo detallado de este ensayo se indica en el artículo de Perrin, M., y cols., *Endocrinology*. Los ensayos de unión competitiva que emplean el péptido del Ejemplo I C o IV A se contemplan particularmente para evaluar si los posibles péptidos y no péptidos tienen alta afinidad para cada uno de los diversos receptores de CRF, p. ej. CRF-RA, CRF-RB_L y CRF-RB_S, como una primera etapa para determinar si un candidato es un antagonista eficaz. En estos ensayos, un antagonista de CRF cíclico apropiado se marca apropiadamente con una sustancia que se detecta fácilmente, tal como un isótopo radiactivo, p. ej. ¹²⁵I, o una enzima o algún otro marcador adecuado, tal como uno que emita fluorescencia.

El uso de ensayos de unión competitiva se considera particularmente valioso para cribar candidatos para nuevos fármacos, p. ej. para identificar nuevos péptidos tipo CRF u otros compuestos que tengan una afinidad de unión aún mayor o más selectiva para receptores de CRF, candidatos que por lo tanto serían potencialmente útiles como fármacos. En el ensayo, se determina la capacidad del posible antagonista para desplazar el péptido marcado. Estos ensayos de cribado que se describen anteriormente en la presente se pueden usar con un antagonista de CRF cíclico radiomarcado, p. ej., (ciclo 30-33)[I¹²⁵-D-Tyr¹², Nle^{21,38}, Glu³⁰, D-His³², Lys³³]/r/hCRF(12-41) para cribar agonistas de CRF potenciales. También se pueden usar ensayos que emplean un antagonista de CRF marcado con alta afinidad para cribar antagonistas de CRF más potentes. También se pueden marcar con una enzima o algún otro marcador adecuado.

Según se usan en la presente, todas las temperaturas son °C y todas las relaciones son en volumen. Los porcentajes de materiales líquidos también son en volumen. Por alquilo inferior se entiende de C₁ a C₆.

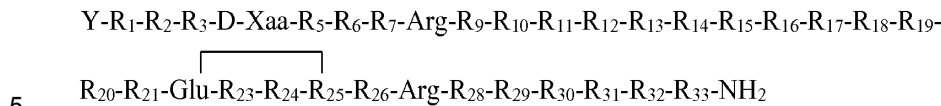
También se divulgan sales farmacéuticamente aceptables y otras formulaciones comparables. Por otra parte, se pueden hacer sustituciones y modificaciones en otras posiciones a lo largo de la cadena peptídica del CRF que se indica en la primera fórmula general en la descripción detallada sin restar valor a la potencia de los antagonistas. Los desarrollos en la especialidad han mostrado que los péptidos que tienen los diversos residuos especificados en la

5 molécula exhiben actividad de CRF. El extremo N de los análogos de 33 residuos se puede extender mediante Tyr o D-Tyr y preferiblemente está acilado por un grupo acilo que tiene de 20 a 15 o menos átomos de carbono, preferiblemente por uno que tiene 7 o menos, p. ej. acetilo. Cuando está incluido D-Tyr, con propósitos de radioyodación, por ejemplo en el extremo N, en lugar de Lys²⁸, puede ser preferible sustituir la Arg que se considera un equivalente en esta posición.

10 En lugar de la amida simple en el extremo C, se puede incorporar una amida sustituida con alquilo inferior, es decir, 1-4 átomos de carbono, p. ej., metilamida o etilamida. También se puede crear un enlace lactama equivalente al conectar las cadenas laterales de Lys²² y Glu²⁵; sin embargo, se prefieren los enlaces ilustrados anteriormente en la presente. El grupo amino que se hace reaccionar para formar el enlace de ciclación de la lactama 22-25 se puede alquilar, tal como al añadir un grupo metilo; se considera que estos cambios crean péptidos cíclicos equivalentes

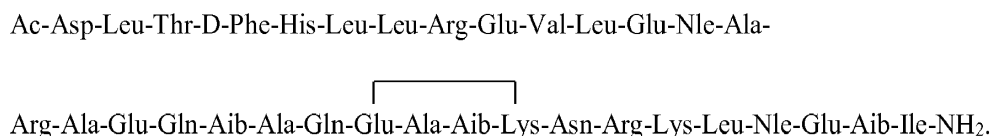
REIVINDICACIONES

1. Un péptido antagonista del factor liberador de corticotropina (CRF) cíclico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, péptido que tiene la secuencia de aminoácidos:

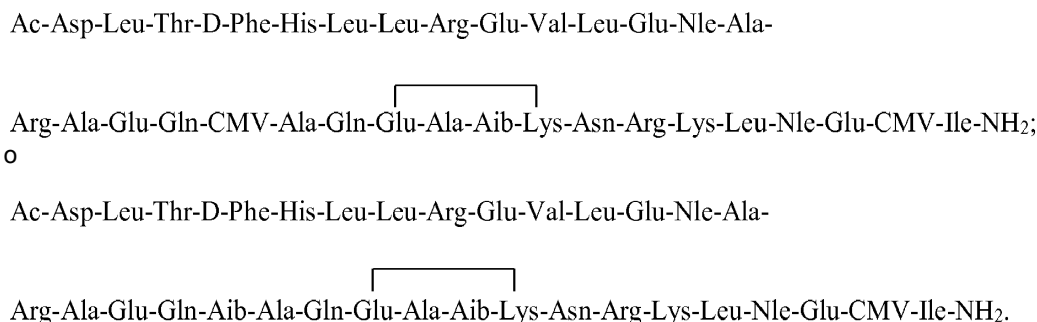


10 en la que Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene hasta 20 átomos de carbono, preferiblemente hasta 12 átomos de carbono, y más preferiblemente de 1 a 7 átomos de carbono, R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; D-Xaa es D-Phe, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-pNO₂Phe, D-Nal, D-Trp, D-Aph(Cbm) o D-Pal; R₅ es His, Tyr o Glu; R₆ es CML o Leu; R₇ es Leu o CML; R₉ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₀ es Val, CML, Nle o Met; R₁₁ es Leu, CML o Ile; R₁₂ es Glu, D-Glu o His; R₁₃ es Nle, Leu, Nva o Met; R₁₄ es Ala, D-Ala, Aib, Dpg, Thr, D-Thr, Glu o D-Glu; R₁₅ es Arg, Orn o Lys; R₁₆ es Ala, Aib, Dpg o CML; R₁₇ es Glu o Asp; R₁₈ es Gln, Asn o Lys; R₁₉ es Leu, CML, Aib, Dpg, CMP o CMV; R₂₀ es Ala, Dpg, o Aib; R₂₁ es Gln, Aib, Dpg o Glu; R₂₃ es Ala, Dpg o Aib; R₂₄ es Aib, Dpg, CML, D-CML, D-Aph(Cbm) o D-Aph(Hor); R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Asn, Aib, Dpg, CML o D-CML; R₂₈ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₂₉ es CML, Leu o Tyr; R₃₀ es Nle, CML o Met; R₃₁ es Glu, Aib, Dpg o Asp; R₃₂ es CMP, CMV, CML, Ile, Aib, Dpg, Thr, Asn, Glu, Ala, Val, Leu, Nle, Phe, Nva, Gly o Gln; y R₃₃ es Ala, Aib, Dpg, Ile, Gly, Val, Leu, CML, Nle, Phe, Nva o Gln; con la condición de que R¹⁹ sea Aib, Dpg, CMP o CMV o que R²⁴ sea CML, D-CML, CMV, CMP, D-Aph(Cbm) o D-Aph(Hor).

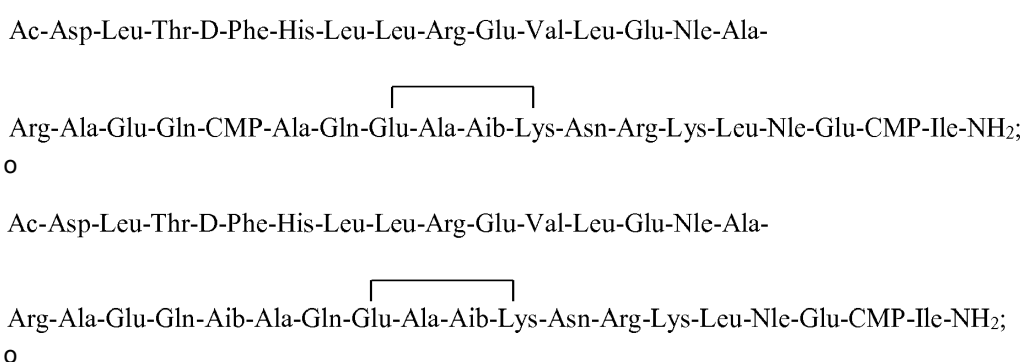
20 2. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 1, que tiene la formula:



25 3. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 1, que tiene la formula:



30 4. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 1 que tiene la formula:



Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-CMP-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-Aib-Ile-NH₂;

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-CML-Gln-CMP-Ala-Gln-Glu-Ala-Aib-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂.

5

5. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 1, que tiene la formula:

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Glu-Ala-D-Aph(Cbm)-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂;

10 o

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Glu-Ala-CML-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂;

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Glu-Ala-D-CML-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂;

15

o

Ac-Asp-Leu-Thr-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-

Arg-Ala-Glu-Gln-CML-Ala-Gln-Glu-Ala-D-Aph(Hor)-Lys-Asn-Arg-Lys-Leu-Nle-Glu-CML-Ile-NH₂.

20

6. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el péptido tiene la secuencia de aminoácidos:

Y-R₁-R₂-R₃-D-Xaa-R₅-R₆-R₇-Arg-R₉-R₁₀-R₁₁-R₁₂-Nle-R₁₄-R₁₅-R₁₆-R₁₇-R₁₈-

Aib-R₂₀-R₂₁-Glu-R₂₃-Aib-R₂₅-R₂₆-Arg-R₂₈-R₂₉-R₃₀-R₃₁-Aib-R₃₃-NH₂

25

en la que Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene aproximadamente 20 o menos átomos de carbono; R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; D-Xaa es D-Phe, D-Leu, D-Tyr, D-Cpa, D-Nal, D-Trp o D-Pal; R₅ es His, Tyr o Glu; R₆ es CML o Leu; R₇ es Leu o CML; R₉ es Glu, CML, Asn o Lys; R₁₀ es Val, CML o Nle; R₁₁ es Leu, CML o Ile; R₁₂ es Glu o His; R₁₄ es Ala, Aib, Thr, o Glu; R₁₅ es Arg, Orn o Lys; R₁₆ es Ala, Aib o CML; R₁₇ es Glu o Asp; R₁₈ es Gln, Asn o Lys; R₂₀ es Ala o Aib; R₂₁ es Gln, Aib o Glu; R₂₃ es Ala o Aib; R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Asn, Aib, CML o D-CML; R₂₈ es Lys, Orn, Arg, Har, CML o Leu; R₂₉ es CML, Leu o Tyr; R₃₀ es Nle o CML; R₃₁ es Glu, Aib o Asp; y R₃₃ es Ala, Aib, Ile, Gly, Val, Leu, CML, Nle, Phe, Nva o Gln.

30

7. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el péptido tiene la secuencia de aminoácidos:

Y-R₁-R₂-R₃-D-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Nle-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-

Aib-R₂₀-R₂₁-Glu-R₂₃-Aib-R₂₅-R₂₆-Arg-Lys-Leu-Nle-R₃₁-Aib-Ile-NH₂

5 en la que Y es H, Tyr o D-Tyr o un grupo acilo que tiene aproximadamente 20 o menos átomos de carbono; R₁ es Asp o des-R₁; R₂ es Leu o des-R₂; R₃ es Ser o Thr o des-R₃; R₂₀ es Ala o Aib; R₂₁ es Gln o Aib; R₂₃ es Ala o Aib; R₂₅ es Lys u Orn; R₂₆ es Asn o Ai; y R₃₁ es Glu.

10 8. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 1, 6 o 7, en el que el grupo acilo se selecciona del grupo que consiste en acetilo, propionilo, butiróilo, valeroílo, hexanoílo, octanoílo, decanoílo, tetradecanoílo y 21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoílo.

9. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 7, en el que el grupo acilo es acetilo.

10. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 7, en el que el grupo acilo es propionilo.

15 11. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 7, en el que el grupo acilo es butiróilo.

12. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 7, en el que el grupo acilo es valeroílo.

20 13. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 7, en el que el grupo acilo es hexanoílo.

14. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 1, en el que Y es un grupo acilo que tiene hasta 15 carbonos.

25 15. El péptido antagonista de CRF cíclico según la reivindicación 1, en el que Y es un grupo acilo y los átomos de carbono se seleccionan del grupo que consiste en Ac, For, Acr y Bz.

16. Una composición farmacéutica que comprende el péptido antagonista de CRF cíclico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 17. La composición farmacéutica según la reivindicación 16, para la reducción de un nivel elevado de ACTH en un mamífero y por lo tanto para el tratamiento de una dolencia relacionada con el estrés, tal como una respuesta inmunitaria inducida por estrés que afecta al tracto gastrointestinal, p. ej. síndrome del intestino irritable o una enfermedad gastrointestinal, o para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, supresión inmunitaria, infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), enfermedad de Alzheimer, anorexia nerviosa, estrés hemorrágico,
35 síndromes de abstinencia de drogas y alcohol, adicción a las drogas, psoriasis, artritis reumatoide y esterilidad.