

POLIPÉPTIDOS SELECTIVOS DE hCRHR2

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a análogos de la UCN2. En particular, la presente invención se refiere a análogos de la UCN2 con mayor potencia, mayor estabilidad química y/o alta selectividad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las urocortinas (UCNs) son péptidos endógenos pertenecientes a la familia del factor liberador de corticotropina (CRF). Esta familia también incluye la hormona liberadora de corticotropina (CRH), también conocida como factor liberador de corticotropina (CRF), las urotensinas y la sauvagina. La familia de péptidos del factor liberador de corticotropina (CRF) actúa a través de los receptores de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), a saber, el receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina (hCRHR1) y el receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina (hCRHR2), codificados por los genes hCRHR1 y hCRHR2, respectivamente. El hCRHR1 se expresa en el sistema nervioso central (SNC), mientras que el hCRHR2 se expresa tanto en el SNC como en diversos tejidos periféricos. La mayor concentración de neuronas CRH se encuentra en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN).

Se conocen tres urocortinas endógenas denominadas urocortina-I (UCN1), urocortina-II (UCN2) y urocortina-III (UCN3). A pesar de la alta homología de secuencia entre las urocortinas, la unión de estos péptidos a hCRHR1 y hCRHR2 es diferente. La UCN1 (y CRH) activan de forma no selectiva el hCRHR1 y hCRHR2, mientras que la UCN2 y la UCN3 muestran una mayor selectividad hacia la hCRHR2. La UCN2 es un neuropéptido de 38 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV (SEQ ID NO: 1).

La familia de péptidos CRH modula la respuesta neuroendocrina al estrés a través del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HPA). Sin embargo, se cree que estos efectos están mediados exclusivamente por la activación del hCRHR1. En consonancia con esto, y a diferencia del CRH, la administración periférica de UCN2 o UCN3 no aumenta la secreción de corticosterona. Además, la activación del hCRHR2 por UCN2 reduce la ingesta de alimentos sin provocar excitación conductual ni efectos ansiogénicos, como se observa en la acción anorexigénica inducida por la activación de las vías de señalización del hCRHR1 cerebral. En conjunto, esto subraya que la respuesta al estrés y los efectos cardiometabólicos beneficiosos mediados por la familia de péptidos CRH pueden separarse mediante el uso de agonistas selectivos del hCRHR2.

Las urocortinas que actúan sobre el hCRHR2 han demostrado efectos hemodinámicos, hormonales y renales notables y beneficiosos en modelos experimentales de insuficiencia cardíaca, como reducciones en la precarga y poscarga cardíacas, aumentos en el gasto cardíaco y la contractilidad, disminución de la presión arterial, mayor vasodilatación y mejoría de la función renal (es decir, mayor aclaramiento de creatinina). En estudios clínicos, se ha demostrado que la UCN2 y la UCN3 tienen acciones vasodilatadoras directas en voluntarios sanos y en pacientes con insuficiencia cardíaca. Estos hallazgos respaldan la utilidad de las urocortinas en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares o renales.

Además, las urocortinas han despertado recientemente un gran interés en el campo de los trastornos metabólicos. La obesidad y los trastornos metabólicos asociados, como la resistencia a la

insulina y la diabetes tipo 2 (DM2), son causas importantes de morbilidad y mortalidad que están alcanzando proporciones epidémicas. La dieta y el ejercicio han demostrado ser eficaces para combatir estas afecciones; sin embargo, la adherencia a estas intervenciones suele ser baja, y es evidente que se necesitan tratamientos adicionales para aliviar la disfunción metabólica.

- 5 Se ha demostrado que la inyección intracerebroventricular de la UCN2 y la UCN3 suprime la ingesta de alimentos. Además, se ha observado que la administración subcutánea crónica de la UCN2 pegilada reduce el peso corporal, inhibe la ingesta de alimentos, mejora la tolerancia a la glucosa y aumenta la captación de glucosa en el músculo esquelético, a la vez que mejora la composición corporal hacia un fenotipo más saludable, es decir, una menor masa grasa y una mayor o preservación de la masa magra.
- 10 Además de los efectos beneficiosos sobre la ingesta de alimentos y la regulación del peso corporal, también se ha informado que la UCN2 mejora la tolerancia a la glucosa en todo el organismo al mejorar la sensibilidad a la insulina del músculo esquelético y aumentar la captación de glucosa estimulada por la insulina en el músculo esquelético. Estos hallazgos sugieren que las urocortinas pueden ser útiles no solo en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, sino también en el tratamiento de trastornos
- 15 metabólicos, como la diabetes y la obesidad, donde tienen el potencial de promover una pérdida de peso saludable y sostenida al reducir la masa de tejido adiposo y, al mismo tiempo, preservar o aumentar la masa corporal magra, al dirigirse selectivamente al hCRHR2 para evitar posibles efectos secundarios inducidos por la activación del eje HPA por el hCRHR1.

- La creciente evidencia de los posibles beneficios de la modulación del receptor hCRHR2 ha propiciado el desarrollo de varios análogos de la UCN2. Un ejemplo de ello es el documento WO 2022/038179 que describe análogos de la UCN2 y sus efectos sobre la presión arterial sistólica, la masa corporal y el porcentaje de grasa corporal. Otros ejemplos de análogos de la UCN2 se pueden encontrar en los documentos WO 2023/285334, WO2018/013803 y WO2023/285347.

- A pesar de la aparición de nuevos análogos de la UCN2, sigue existiendo en el campo la necesidad de análogos de la UCN2 mejorados, en particular análogos de la UCN2 con alta selectividad por el hCRHR2 sobre el hCRHR1, alta potencia, alta solubilidad y alta estabilidad física y química a pH fisiológico.

La presente invención tiene por objeto proporcionar péptidos que actúan como agonistas selectivos del hCRHR2, que muestran una alta selectividad por el hCRHR2 sobre el hCRHR1, alta solubilidad, mayor estabilidad química y/o una potencia mejorada del hCRHR2.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a análogos de la UCN2 con alta solubilidad, mayor potencia, alta estabilidad química y selectividad mejorada para el hCRHR2 sobre el hCRHR1. La invención se establece en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 35 La Fig. 1 muestra el efecto sobre la potencia de hCRHR2 y hCRHR1 al introducir residuos de glutamato (E) en las posiciones X²¹, X²², X²³, X²⁴, X²⁵, X²⁶, X²⁷, X²⁸, X³³, X³⁵, X³⁶, X³⁷, X³⁹, X⁴⁰, o X⁴¹, respectivamente. Un valor SHAP positivo indica un aumento de pEC₅₀ en hCRHR2 o hCRHR1. Un valor SHAP negativo indica una disminución de pEC₅₀ en el hCRHR2 o el hCRHR1.

La Fig. 2A muestra el promedio de hCRHR1-pEC₅₀ y hCRHR2-pEC₅₀ obtenido al introducir un residuo de lisina lipidada (K) en cada una de las posiciones X⁴-X⁴¹ en la cadena principal de la UCN2 que tiene X³⁶=E y X⁴⁰=E (SEQ ID NO: 228).

La Fig. 2B muestra la relación de selectividad (hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀) obtenida al introducir un residuo de lisina lipidada (K) en cada una de las posiciones X⁴-X⁴¹ en la estructura principal de la UCN2 que tiene X³⁶=E y X⁴⁰=E (SEQ ID NO: 228).

La Fig. 3 muestra los valores medios de SHAP en la sustitución de diferentes residuos de aminoácidos en el análogo lipidado de la UCN2 SEQ ID NO: 3 (referencia 1).

La Fig. 4 muestra la mejora en la selectividad obtenida mediante la sustitución de diferentes residuos de aminoácidos en la posición X²⁰ de la referencia 1 (SEQ ID NO: 205) o de la referencia 2 (SEQ ID NO: 124).

La Fig. 5 muestra que los péptidos seleccionados (SEQ ID NO: 16 y 215) reducen el peso corporal en ratones DIO (n=9, media ± SEM). Peso corporal relativo al primer día de administración (día 1 del estudio). *: p < 0.05, ***: p < 0.001 en comparación con el vehículo.

La Fig. 6 muestra la presión arterial media medida por radiotelemedría en ratones sanos, conscientes y en libre movimiento, tratados con (SEQ ID NO: 3) (n=4-6/grupo, media ± SEM).

La Fig. 7 muestra las frecuencias cardíacas medidas por radiotelemedría en ratones sanos, conscientes y en libre movimiento, tratados con (SEQ ID NO: 3) (n=4-6/grupo, media ± SEM).

La Fig. 8 muestra los efectos hemodinámicos en ratas espontáneamente hipertensas conscientes y en libre movimiento tratadas con (SEQ ID NO: 3). A) Presión arterial media. B) Frecuencia cardíaca. (n=8/grupo, media ± SEM).

Las Figs. 9A-F muestran las propiedades hemodinámicas y de seguridad de la SEQ ID NO: 3 tras la administración subcutánea en bolo con dosis crecientes (0.03, 0.1, 0.3 y 1.0 mg/kg), medidas en cerdos sanos, conscientes y en libre movimiento mediante radiotelemedría. A) Frecuencia cardíaca. B) Presión arterial media. C) Contractilidad. D) Relajación. E) Intervalo PR, ECG. F) Intervalo QT. Los datos son la media de n=4-8 animales por grupo.

Las Figs. 10A - F muestran las propiedades hemodinámicas y de seguridad de la SEQ ID NO: 3 tras la administración subcutánea en bolo una vez por semana (0.3 mg/kg), medidas en cerdos sanos, conscientes y en libre movimiento mediante radiotelemedría. A) Frecuencia cardíaca. B) Presión arterial media. C) Contractilidad. D) Relajación. E) Intervalo PR, ECG. F) Intervalo QT. Los datos son la media de n=6-8 animales por grupo ± SEM.

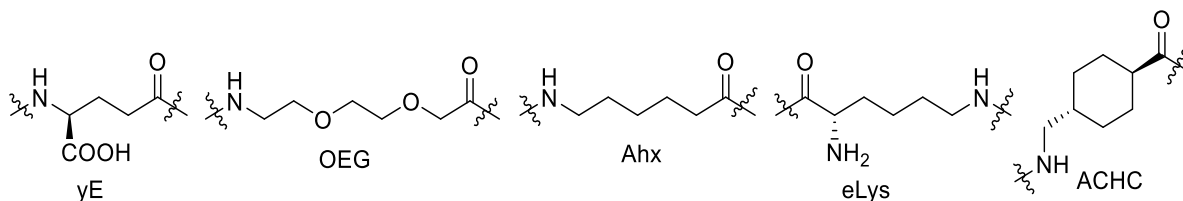
Las Figs. 11A - D muestran los efectos hemodinámicos de la administración de la SEQ ID NO: 215. A) Contractilidad (n=4-12, media ± SEM). B) Flujo sanguíneo coronario (n=1-6, media ± SEM). C) Producto frecuencia-presión (n=1-10, media ± SEM). D) Producto frecuencia-presión frente a contractilidad.

A continuación, se describirán con más detalle las modalidades de la invención, en relación con las figuras adjuntas.

En el presente contexto, la lipidación se refiere a la unión covalente de un lípido, opcionalmente a través de un enlazador/espaciador, a un agonista de la UCN2 según la presente invención. El lípido puede ser un C18DA (ácido octadecanodioico) o un C20DA (ácido icosanodioico), opcionalmente conectados a

través de un enlazador/espaciador que consiste de una o más unidades unidas covalentemente, comúnmente utilizadas en la técnica. Los enlazadores/espaciadores comúnmente utilizados pueden ser, entre otros, [yE], [OEG], [eLys], [ACHC] o [AHX], como se ilustra a continuación.

5



10

La lipidación se realiza típicamente para mejorar el perfil farmacocinético de un polipéptido, por ejemplo, mejorando la estabilidad metabólica, reduciendo la degradación enzimática, disminuyendo la excreción y el metabolismo, lo que en conjunto resulta en una vida media *in vivo* prolongada ($t_{1/2}$). Los agonistas de la UCN2 según la presente invención pueden lipidarse utilizando varios lípidos (y espaciadores/enlazadores) comúnmente utilizados en la técnica, dependiendo de la vida media deseada.

15

Los polipéptidos pueden lipidarse, por ejemplo, en un residuo de lisina (K) como se ejemplifica en el presente documento. Preferiblemente, la lipidación se realiza en un residuo de lisina (K) en la posición X^{20} , X^{25} , X^{28} , X^{29} , X^{32} , X^{33} o X^{40} , siendo más preferiblemente la posición X^{32} o X^{33} . Preferiblemente, el lípido (y el enlazador/espaciador) se selecciona de la lista que consiste de C16DA (ácido hexadecanodioico), C18DA, C20DA, C18DA[yE]-, C18DA[yE][yE]-, C18DA[yE][OEG]-, C18DA[yE][OEG][OEG]-, C18DA[yE][yE][OEG][OEG]-, C18DA[yE][AHX]-, C18DA[yE][yE][AHX]-, C20DA[yE]-, C20DA[yE][yE]-, C20DA[yE][OEG]-, C20DA[yE][OEG][OEG]-, C20DA[yE][yE][OEG][OEG]-, C20DA[yE][AHX]-, o C20DA[yE][yE][AHX]-. Más preferiblemente, el lípido (y el enlazador) se selecciona de la lista que consiste de C18DA[yE]-, C18DA[yE][yE]-, C18DA[yE][OEG]-, C18DA[yE][OEG][OEG]-, C18DA[yE][yE][OEG][OEG]-, C20DA[yE]-, C20DA[yE][yE]-, C20DA[yE][OEG]-, C20DA[yE][OEG][OEG]- o C20DA[yE][yE][OEG][OEG]-. Lo más preferible es que la lipidación sea C20DA[yE][yE][OEG][OEG]-.

25

Los aminoácidos mencionados en el presente documento se refieren a los aminoácidos naturales (es decir, aminoácidos L) a menos que se indique lo contrario. La abreviatura Aib se refiere al ácido 2-aminoisobutírico. La abreviatura Nle se refiere a la L-norleucina (ácido (2S)-2-aminohexanoico). Mel se refiere a la N-metil-L-isoleucina. Hyp se refiere a la L-hidroxiprolina ((2S,4R)-4-hidroxiprolina). Cle se refiere a la cicloleucina (ácido 1-aminociclopentano-1-carboxílico). c4NHPro se refiere a la cis-4-amino-L-prolina ((2S,4S)-L-Pro(4-NH₂)-OH). c4FPro se refiere a la cis-4-fluoro-L-prolina ((2S,4S)-L-Pro(4-F)-OH). En el presente contexto, una sustitución en un derivado es preferiblemente una sustitución conservadora a un aminoácido conservador. Los grupos de aminoácidos conservados se pueden definir como: G, A, V, L, I, P (alifáticos o cíclicos); S, C, T, M (hidroxilo o que contienen azufre); F, Y, W (aromáticos); H, K, R (básicos); D, E, N, Q (ácidos o amidas).

35

En el presente contexto, debe entenderse que todos los péptidos según la invención poseen una carboxamida C-terminal (-CONH₂). Asimismo, debe entenderse que los polipéptidos pueden tener una amina libre (-NH₂) en el extremo N-terminal, estar N-acilados (-NHCOR) con, por ejemplo, un grupo acetilo (Ac) en el extremo N-terminal, estar N-metilados (-NHCH₃ o -N(CH₃)₂) en el extremo N-terminal o estar

desaminados en el extremo N-terminal. En la modalidad mas preferida, los polipéptidos están mono-N-metilados (-NHCH₃) en el extremo N-terminal.

Los valores de EC₅₀ se utilizan como medida de la potencia agonista en el receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina (hCRHR1) y en el receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina (hCRHR2). Un valor de EC₅₀ indica la concentración de un compuesto necesaria para alcanzar la mitad de su actividad máxima en un ensayo específico. En este contexto, un agonista selectivo de hCRHR2 debe entenderse como un agonista con una relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ de al menos 500. Preferiblemente, esta relación de selectividad es superior a la de la UCN2 nativa (relación de selectividad de 917, véase la Tabla 2). Por lo tanto, preferiblemente, la relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ es de al menos 1000, más preferiblemente, la relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ es de al menos 1500, aún más preferiblemente, la relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ es de al menos 2000, aún más preferiblemente, la relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ es de al menos 2500, y lo más preferiblemente, la relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ es de al menos 3000, cuando se mide utilizando el ensayo y las condiciones descritas en el presente documento para péptidos purificados. Como los valores de EC₅₀ pueden depender del tipo de ensayo realizado o de las condiciones específicas del ensayo, el EC₅₀ para UCN2 se ha proporcionado aquí como un estándar interno para la comparación entre diferentes ejecuciones de ensayo o incluso diferentes ensayos. Como se demuestra en el presente documento, la relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ puede ser >5000. La relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ también se denomina indistintamente selectividad.

Además, los agonistas selectivos del hCRHR2 de la invención tienen una potencia de hCRHR1 en relación con el UCN2 nativo [(hCRHR1-EC₅₀ péptido de la invención)/(hCRHR1-EC₅₀ UCN2) de al menos 10, como por ejemplo al menos 15, como por ejemplo al menos 20, cuando se mide utilizando el ensayo y las condiciones descritas en el presente documento para péptidos purificados.

Los agonistas de la UCN2 según la presente invención pueden presentarse en forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptables. Por lo tanto, se entiende por sales farmacéuticamente aceptables cualquier sal que se utilice habitualmente en formulaciones de péptidos. Dichas sales incluyen tanto sales de adición de ácido como sales básicas, y pueden encontrarse ejemplos en la 17^a edición de *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

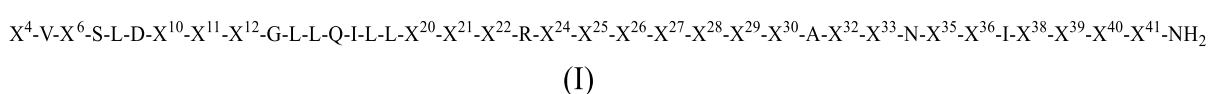
La presente invención se refiere a análogos de la UCN2 con alta solubilidad, potencia mejorada, alta estabilidad química y selectividad mejorada para el hCRHR2 sobre el hCRHR1. Más particularmente, la presente invención se refiere al hallazgo de que se pueden obtener análogos de la UCN2 con alta solubilidad incorporando al menos dos residuos de glutamato (E) en la posición X²¹, X²², X²⁴, X²⁵, X²⁶, X²⁷, X²⁸, X³³, X³⁵, X³⁶, X³⁹, o X⁴⁰, sin efectos adversos importantes sobre la potencia y selectividad de hCRHR2 (véase el Ejemplo 1). La presente invención se refiere además al hallazgo de que la lipidación en la posición X²⁰, X²⁵, X²⁷, X²⁸, X²⁹, X³², X³³ o X⁴⁰ proporcionó la mayor relación de selectividad para el hCRHR2 sobre el hCRHR1 (véase el Ejemplo 2). La presente invención también se refiere al hallazgo de que se pueden obtener análogos de la UCN2 con estabilidad química mejorada mediante ciertos residuos de aminoácidos en la posición X³³ o X³⁵ (véase el Ejemplo 3). Además, la presente invención se refiere al hallazgo de que

se pueden obtener análogos de la UCN2 con potencia mejorada para hCRHR2 mediante la introducción de ciertos aminoácidos en la posición X⁶, X¹⁰, X¹¹, X¹² y/o X³⁸, en particular un residuo de norleucina (Nle) en la posición X³⁸ (véase el Ejemplo 4). Finalmente, la presente invención se refiere al hallazgo de que ciertos aminoácidos en la posición X²⁰, X²¹, X²⁶, X³⁰ y/o X⁴¹ pueden mejorar la relación de selectividad, en particular, en presencia de un residuo Nle que mejora la potencia en la posición X³⁸.

Análogos de la UCN2 con alta solubilidad y alta selectividad para hCRHR2

Como se muestra en el Ejemplo 1, las posiciones de aminoácidos X²¹, X²², X²⁴, X²⁵, X²⁶, X²⁷, X²⁸, X³³, X³⁵, X³⁶, X³⁹ y X⁴⁰ se identificaron como posiciones adecuadas para incorporar un residuo de glutamato (E) para aumentar la solubilidad de los péptidos. Además, como se muestra en el Ejemplo 2, las posiciones de aminoácidos X²⁰, X²⁵, X²⁸, X²⁹, X³², X³³ y X⁴⁰ se identificaron como posiciones adecuadas para introducir un residuo de lisina lipidada (K) para alterar las propiedades farmacocinéticas de los péptidos, a la vez que se proporciona la mayor selectividad para el hCRHR2 sobre el hCRHR1.

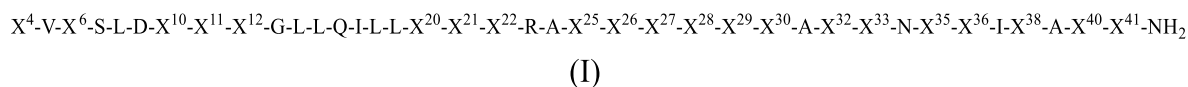
Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



donde X⁴ se selecciona como I, Mel o P; X⁶ se selecciona como L o T; X¹⁰ se selecciona como Cle o V; X¹¹ se selecciona como P o Hyp; X¹² se selecciona como I o L; X²⁰ se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X²¹ se selecciona como Q, E o L; X²² se selecciona como A o E; X²⁴ se selecciona como A o E; X²⁵ se selecciona como R, E o K; X²⁶ se selecciona como A, E o L; X²⁷ se selecciona como A, E o K; X²⁸ se selecciona como R, E o K; X²⁹ se selecciona como E o K; X³⁰ se selecciona como Q o R; X³² se selecciona como T o K; X³³ se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X³⁵ se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X³⁶ se selecciona como R o E; X³⁸ se selecciona como L o Nle; X³⁹ se selecciona como A o E; X⁴⁰ se selecciona como R, E o K; X⁴¹ es V o I; y en el que solamente uno de X²⁰, X²⁵, X²⁷, X²⁸, X²⁹, X³², X³³, o X⁴⁰, se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además, en el que al menos dos de X²¹, X²², X²⁴, X²⁵, X²⁶, X²⁷, X²⁸, X³³, X³⁵, X³⁶, X³⁹ y X⁴⁰ se seleccionan como E.

Es mayormente preferible que al menos dos de X²², X³³, X³⁶ y X⁴⁰ sean seleccionados como E para mejorar la solubilidad de los péptidos.

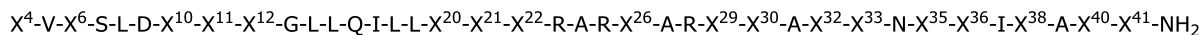
Así, en una modalidad preferida del primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



donde X⁴ se selecciona como I, Mel o P; X⁶ se selecciona como L o T; X¹⁰ se selecciona como Cle o V; X¹¹ se selecciona como P o Hyp; X¹² se selecciona como I o L; X²⁰ se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X²¹ se selecciona como Q o L; X²² se selecciona como A o E; X²⁵ se selecciona como R o K; X²⁶ se selecciona como A o L; X²⁷ se selecciona como A o K; X²⁸ se selecciona como R o K;

X^{29} se selecciona como E o K; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{36} se selecciona como R o E; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{40} se selecciona como R, E o K; X^{41} es V o I; y en el que solo uno de X^{20} , X^{25} , X^{27} , X^{28} , X^{29} , X^{32} , X^{33} , o X^{40} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además en el que al menos dos de X^{22} , X^{33} , X^{36} , y X^{40} se seleccionan como E.

En una modalidad preferida del primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



(I)

donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como I o L; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{22} se selecciona como A o E; X^{26} se selecciona como A o L; X^{29} se selecciona como E o K; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{36} se selecciona como R o E; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{40} se selecciona como R, E o K; X^{41} es V o I; y en el que solo uno de X^{20} , X^{29} , X^{32} , X^{33} , o X^{40} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además en el que al menos dos de X^{22} , X^{33} , X^{36} , y X^{40} se seleccionan como E.

En la modalidad más preferida, se seleccionan X^{36} y X^{40} como E para aumentar la solubilidad de los péptidos.

Así, en una modalidad más preferida del primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).

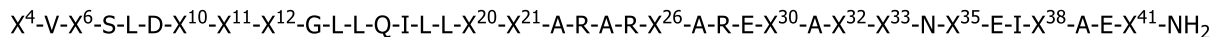


(I)

donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como I o L; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{29} se selecciona como E o K; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y en el que solo uno de X^{20} , X^{29} , X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

Todas las posiciones de aminoácidos X^{20} , X^{25} , X^{28} , X^{29} , X^{32} , X^{33} y X^{40} fueron identificadas como posiciones adecuadas para introducir una lisina lipidada con el fin de modificar las propiedades farmacocinéticas de los péptidos y, al mismo tiempo, proporcionar una alta selectividad para hCRHR2. Sin embargo, es mas preferido utilizar X^{32} o X^{33} como sitio de lipidación.

Así, en una modalidad aún más preferida del primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



(I)

donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como I o L; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y en el que solamente uno se selecciona o de X^{32} o X^{33} como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

En una modalidad aún más preferida del primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



(I)

donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y donde solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

En una modalidad mayormente preferida del primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



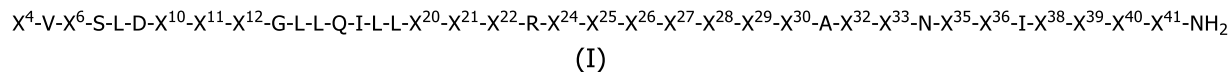
(I)

donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K o Aib; X^{35} se selecciona como A, L, I o V; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y X^{32} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

Análogos de la UCN2 con estabilidad química mejorada

La posición X^{34} se identificó como un residuo químicamente lábil en la estructura principal de la UCN2. Como se muestra en el Ejemplo 3, la sustitución del aminoácido alanina (A) en la posición X^{35} por los aminoácidos Aib, L, I o V, o la sustitución del aminoácido treonina (T) en la posición X^{33} por los aminoácidos E, K(Lip) o Aib, resultó en una mejora significativa de la estabilidad química sin afectar la potencia o con una pérdida mínima de la misma.

Así, en un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



5

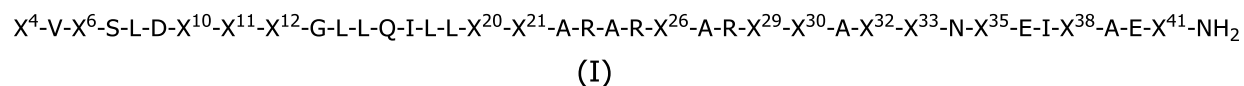
donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como I o L; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q, E o L; X^{22} se selecciona como A o E; X^{24} se selecciona como A o E; X^{25} se selecciona como R, E o K; X^{26} se selecciona como A, E o L; X^{27} se selecciona como A, E o K; X^{28} se selecciona como R, E o K; X^{29} se selecciona como E o K; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, Aib, L, I o V; X^{36} se selecciona como R o E; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{39} se selecciona como A o E; X^{40} se selecciona como R, E o K; X^{41} es V o I; y en el que solo uno de X^{20} , X^{25} , X^{27} , X^{28} , X^{29} , X^{32} , X^{33} , o X^{40} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además en el que al menos dos de X^{21} , X^{22} , X^{24} , X^{25} , X^{26} , X^{27} , X^{28} , X^{33} , X^{35} , X^{36} , X^{39} , y X^{40} se seleccionan como E; y además, donde X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V cuando X^{33} es T, o donde X^{33} se selecciona como E, K o Aib, donde K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador cuando X^{35} es A.

10

15

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)

20



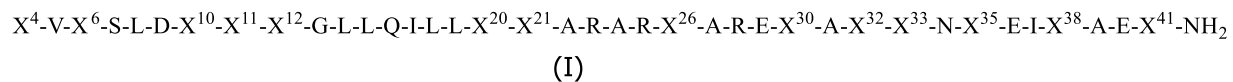
25

30

donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como I o L; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{29} se selecciona como E o K; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K o Aib; X^{35} se selecciona como A, Aib, L, I o V; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y en el que solamente uno de X^{20} , X^{29} , X^{32} , o X^{33} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además en el que X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V cuando X^{33} es T, o en el que X^{33} se selecciona como E, K o Aib, en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador cuando X^{35} es A.

En una modalidad aún más preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)

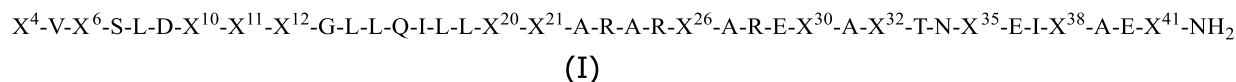
35



donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como I o L; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{30} se selecciona

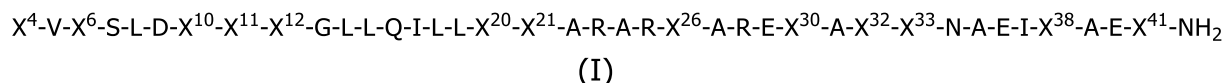
como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K o Aib; X^{35} se selecciona como A, Aib, L, I o V; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y donde solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además, donde X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V cuando X^{33} es T, o donde X^{33} se selecciona como E, K o Aib, donde K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador cuando X^{35} es A.

En una modalidad aún más preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



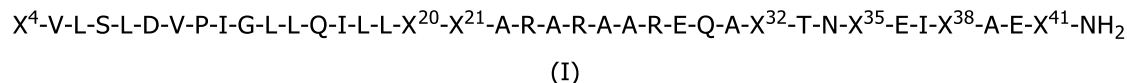
donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como I o L; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y donde X^{32} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

En una modalidad aún más preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



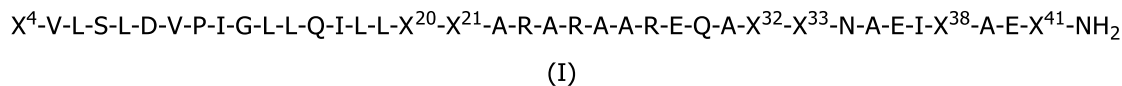
donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como I o L; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como E, K o Aib; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y donde solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

En otra modalidad aún más preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y donde X^{32} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

En otra modalidad aún más preferida del primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



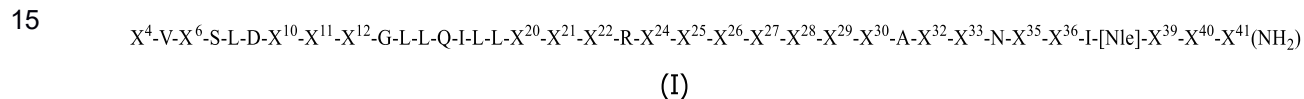
donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como E, K o Aib; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{41} es V o I; y donde solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

Se prefiere que $X^{33}=T$ y $X^{35}=Aib$, L, I o V, preferiblemente Aib, para garantizar una alta estabilidad química.

Análogos de la UCN2 con potencia mejorada

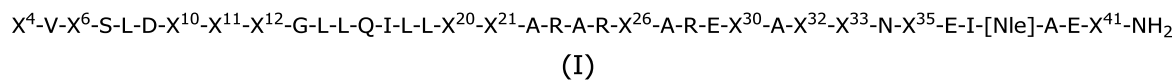
Como se muestra en el Ejemplo 4, ciertos residuos de aminoácidos en las posiciones X^6 , X^{10} , X^{11} , X^{12} y/o X^{38} tuvieron un efecto positivo (es decir, aumentaron) la potencia de hCRHR2. En particular, un residuo de norleucina (Nle) en la posición X^{38} resultó en una mayor potencia de hCRHR2.

Así, en un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con potencia hCRHR2 mejorada que comprende la estructura de la Fórmula (I).



donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como I o L; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q, E o L; X^{22} se selecciona como A o E; X^{24} se selecciona como A o E; X^{25} se selecciona como R, E o K; X^{26} se selecciona como A, E o L; X^{27} se selecciona como A, E o K; X^{28} se selecciona como R, E o K; X^{29} se selecciona como E o K; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{36} se selecciona como R o E; X^{39} se selecciona como A o E; X^{40} se selecciona como R, E o K; X^{41} es V o I; y en el que solo uno de X^{20} , X^{25} , X^{27} , X^{28} , X^{29} , X^{32} , X^{33} , o X^{40} , se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además, en el que al menos dos de X^{21} , X^{22} , X^{24} , X^{25} , X^{26} , X^{27} , X^{28} , X^{33} , X^{35} , X^{36} , X^{39} , y X^{40} se seleccionan como E.

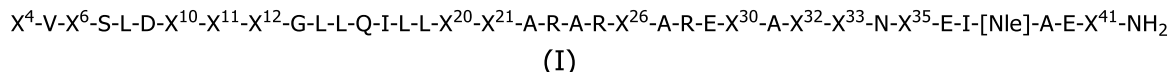
En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como L o I; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{41} es V o I; y en el

que solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

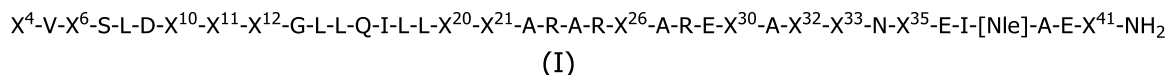
En una modalidad más preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X^4 se selecciona como I, Met o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como L o I; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K o Aib; X^{35} se selecciona como A, Aib, L, I o V; X^{41} es V o I; y donde solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además, donde X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V cuando X^{33} es T, o donde X^{33} se selecciona como E, K o Aib, donde K se lipida opcionalmente a través de un enlazador/espaciador cuando X^{35} es A.

En algunas modalidades mayormente preferidas en las que X^{38} se selecciona como Nle, la potencia puede mejorarse aún más seleccionando X^6 como T; X^{10} como Cle; X^{11} como Hyp; y/o X^{12} como I o L.

En otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



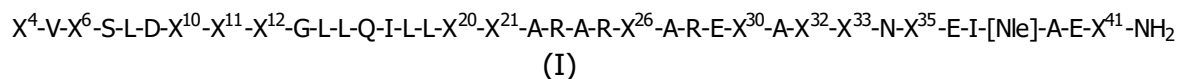
donde X^4 se selecciona como I, Met o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como L o I; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{41} es V o I; y en el que solo se selecciona uno de X^{32} o X^{33} como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

Análogos de la UCN2 con potencia mejorada y alta selectividad

Como se muestra en el presente documento, un residuo de norleucina (Nle) en la posición X^{38} resultó en una potencia mejorada de hCRHR2, pero con una caída simultánea en la selectividad para hCRHR2 (ver Ejemplo 4, Tabla 3). Como se muestra en la Fig. 3, ciertos residuos de aminoácidos en las posiciones X^{20} , X^{21} , X^{26} , X^{30} y/o X^{41} . Se encontró que disminuían la potencia de hCRHR1 mientras que la potencia de hCRHR2 permanecía sin cambios. Estas posiciones (es decir, X^{20} , X^{21} , X^{26} , X^{30} y/o X^{41}) pueden usarse para recuperar una alta selectividad cuando se introducen sustituciones que mejoran la potencia, por ejemplo, Nle en la posición X^{38} . Como se muestra en la Fig. 4 para la posición X^{20} , se encontró que todos los residuos de aminoácidos A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V disminuían la potencia de hCRHR1 sin comprometer la potencia de hCRHR2 (ver Ejemplo 5, Fig. 4). Como se muestra en la Fig. 3 para la

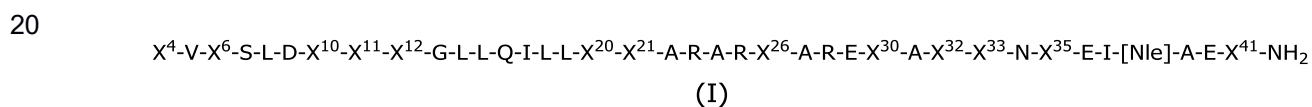
posición X²¹, leucina (L); para la posición X²⁶, leucina (L); también se descubrió que la arginina (R) en la posición X³⁰ y la isoleucina (I) en la posición X⁴¹ disminuían la potencia de hCRHR1 sin comprometer la potencia de hCRHR2.

En una modalidad mayormente preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X⁴ se selecciona como I, Met o P; X⁶ se selecciona como L o T; X¹⁰ se selecciona como Cle o V; X¹¹ se selecciona como P o Hyp; X¹² se selecciona como L o I; X²⁰ se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X²¹ se selecciona como Q o L; X²⁶ se selecciona como A o L; X³⁰ se selecciona como Q o R; X³² se selecciona como T o K; X³³ se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X³⁵ se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X⁴¹ es V o I; y en la que solamente de X³² o X³³ se selecciona como K, y en la que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador, y además en la que se selecciona al menos uno de X²⁰, X²¹, X²⁶, X³⁰ o X⁴¹ de la siguiente manera, X²⁰ se selecciona como A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V; X²¹ se selecciona como L; X²⁶ se selecciona como L; X³⁰ se selecciona como R; o X⁴¹ se selecciona como I.

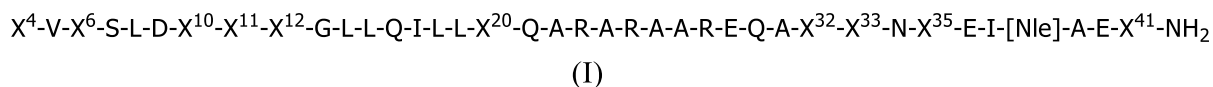
En una modalidad mayormente preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X⁴ se selecciona como I, Met o P; X⁶ se selecciona como L o T; X¹⁰ se selecciona como Cle o V; X¹¹ se selecciona como P o Hyp; X¹² se selecciona como L o I; X²⁰ se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X²¹ se selecciona como Q o L; X²⁶ se selecciona como A o L; X³⁰ se selecciona como Q o R; X³² se selecciona como T o K; X³³ se selecciona como T, E, K o Aib; X³⁵ se selecciona como A, Aib, L, I o V; X⁴¹ es V o I; y donde solamente uno de X³² o X³³ se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además, donde X³⁵ se selecciona como Aib, L, I o V cuando X³³ es T, o donde X³³ se selecciona como E, K o Aib, donde K se lipida opcionalmente a través de un enlazador/espaciador cuando X³⁵ es A; y además, donde al menos uno de X²⁰, X²¹, X²⁶, X³⁰ o X⁴¹ se selecciona de la siguiente manera, X²⁰ se selecciona como A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V; X²¹ se selecciona como L; X²⁶ se selecciona como L; X³⁰ se selecciona como R; o X⁴¹ se selecciona como I.

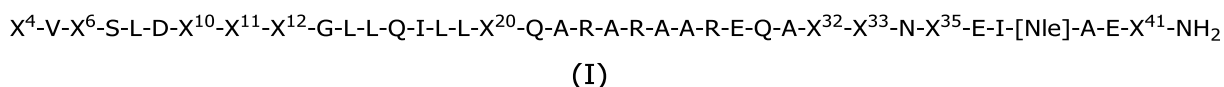
Más preferiblemente, la posición X²⁰ o bien X⁴¹ se utiliza para mejorar la selectividad, y X²¹, X²⁶ y X³⁰ se seleccionan como el aminoácido nativo en UCN2.

Así, en una modalidad más preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como L o I; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{41} es V o I; y en el que solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador, y además en el que uno de X^{20} o X^{41} se selecciona de la siguiente manera; X^{20} se selecciona A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V ; o X^{41} se selecciona como I.

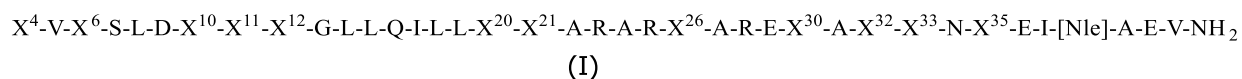
Así, en una modalidad aún más preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como L o I; X^{20} se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K o Aib; X^{35} se selecciona como A, Aib, L, I o V; X^{41} es V o I; y donde solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además, donde X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V cuando X^{33} es T, o donde X^{33} se selecciona como E, K o Aib, donde K se lipida opcionalmente a través de un enlazador/espaciador cuando X^{35} es A; y además, donde uno de X^{20} o X^{41} se selecciona de la siguiente manera; X^{20} se selecciona A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V ; o X^{41} se selecciona como I.

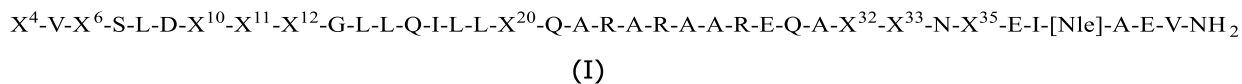
Lo más preferiblemente, se utiliza la posición X^{20} para recuperar la selectividad en presencia de un Nle que mejora la potencia en la posición X^{38} , y lo más preferiblemente, se selecciona X^{41} como V.

Por lo tanto, en otra modalidad preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como L o I; X^{20} se selecciona como A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{26} se selecciona como A o L; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; y en el que solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador.

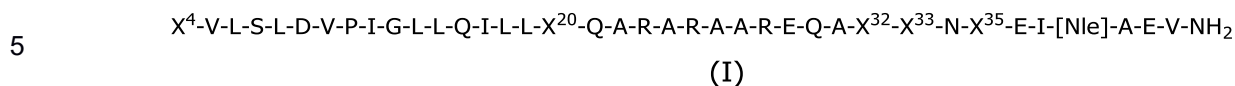
En una modalidad aún más preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X^4 se selecciona como I, Mel o P; X^6 se selecciona como L o T; X^{10} se selecciona como Cle o V; X^{11} se selecciona como P o Hyp; X^{12} se selecciona como L o I; X^{20} se selecciona como A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K o Aib; X^{35} se selecciona como A, Aib, L, I o V; y donde solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además donde X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V cuando X^{33} es T, o donde X^{33} se selecciona como E, K o Aib, donde la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador cuando X^{35} es A.

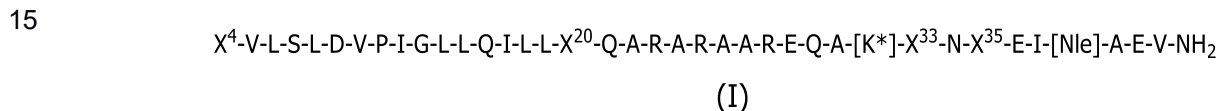
En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha indicado o mostrado ya, es más preferible que X^4 se seleccione como Mel o P, preferiblemente X^4 es Mel. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^6 se seleccione como L. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{10} se seleccione como V. En cualquiera de las modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{11} se seleccione como P. En cualquiera de las modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{12} se seleccione como I. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{20} se seleccione como N, F, G, K, Q, S o T, cuando $X^3=Nle$; preferiblemente X^{20} se selecciona como S, cuando $X^{38}=Nle$. Cuando X^{38} es L, es más preferible que X^{20} se seleccione como E, N, F, G, K, Q, S o T; más preferiblemente, X^{20} se selecciona como E o S. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{21} se seleccione como Q. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{22} se seleccione como A. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{24} se seleccione como A. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{25} se seleccione como R. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{26} se seleccione como A. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{27} se seleccione como A. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{28} se seleccione como R. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{29} se seleccione como E. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{30} se seleccione como Q. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{38} se seleccione como Nle. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{35} se seleccione como Aib, cuando X^{33} es T. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{33} se seleccione como Aib o K, donde K se lipida opcionalmente a través de un enlazador/espaciador cuando X^{35} es A. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{39} se seleccione como A. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{41} se seleccione como V. En cualquiera de los aspectos y modalidades anteriores, si no se ha mostrado ya, es más preferible que X^{36} y X^{40} se seleccionen como E.

Por lo tanto, en una modalidad particularmente preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X^4 se selecciona como Met o P; X^{20} se selecciona como N, F, G, K, Q, S o T, más preferiblemente X^{20} se selecciona como S; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K o Aib; X^{35} se selecciona como A, Aib, L, I o V; y en el que solo uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además en el que X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V, cuando X^{33} es T, o en el que X^{33} se selecciona como E, K o Aib, en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador cuando X^{35} es A.

En otra modalidad particularmente preferida, la presente invención se refiere a un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I).



donde X^4 se selecciona como Met o P; X^{20} se selecciona como N, F, G, K, Q, S o T, más preferiblemente X^{20} se selecciona como S; X^{33} se selecciona como T o Aib; X^{35} se selecciona como A o Aib; y además, donde X^{35} se selecciona como Aib, si X^{33} es T, o donde X^{33} se selecciona como Aib, si X^{35} es A; * denota una unión covalente de un lípido, opcionalmente a través de un enlazador/espaciador, al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de lisina.

En una modalidad aún más preferida, el péptido se selecciona de la lista que consiste de:

[Met]VLSDVPIGLLQILLSQARARAAREQA[K*]TN[Aib]EI[Nle]AEV(NH₂) (SEQ ID NO: 215),
25 PVLSLDVPIGLLQILLSQARARAAREQA[K*][Aib]NAEI[Nle]AEV(NH₂) (SEQ ID NO: 238),
[Met]VLSDVPIGLLQILLEQARARAAREQAT[K*]NAEILAEV(NH₂) (SEQ ID NO: 6), o
[Met]VLSDVPIGLLQILLEQARARAAREQA[K*]TN[Aib]EILAEV(NH₂) (SEQ ID NO: 16),

donde el * denota una unión covalente de un lípido, opcionalmente a través de un enlazador/espaciador, al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de la lisina.

30 El lípido (y el enlazador/espaciador) puede seleccionarse de entre cualquier lípido (y enlazador/espaciador) conocido en la técnica. Más preferiblemente, el lípido (y el enlazador/espaciador) es C20DA[ν E][ν E][OEG][OEG]-.

En una modalidad particularmente preferida, el péptido es [Met]VLSDVPIGLLQILLSQARARAAREQA[K*]TN[Aib]EI[Nle]AEV(NH₂) (SEQ ID NO: 215), donde el *
35 denota una unión covalente de un lípido al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de lisina, donde el lípido (y el enlazador/espaciador) es C20DA[ν E][ν E][OEG][OEG]-.

Será evidente para aquellos expertos en la materia que cualquiera de los hallazgos descritos en el presente documento con respecto a las posiciones óptimas para mejorar la solubilidad sin comprometer la potencia o la selectividad (es decir, al menos dos residuos de glutamato (E) en la posición X^{21} , X^{22} , X^{24} , X^{25} ,

X^{26} , X^{27} , X^{28} , X^{33} , X^{35} , X^{36} , X^{39} o X^{40}); sitios de lipidación óptimos para alterar la PK mientras se garantiza la mayor selectividad posible para el hCRHR2 sobre el hCRHR1 (es decir, una lisina lipidada en una de las posiciones X^{20} , X^{25} , X^{27} , X^{28} , X^{29} , X^{32} , X^{33} o X^{40}); las posiciones para mejorar la estabilidad química (es decir, aminoácidos específicos en la posición X^{33} o X^{35}); las posiciones para mejorar la potencia de hCRHR2 (es decir, residuos de aminoácidos específicos en las posiciones X^6 , X^{10} , X^{11} , X^{12} y/o X^{38} , en particular un residuo de norleucina (Nle) en la posición X^{38}); y las posiciones para mejorar la relación de selectividad (es decir, residuos de aminoácidos específicos en las posiciones X^{20} , X^{21} , X^{26} , X^{30} y/o X^{41} , en particular, en presencia de un residuo de Nle que mejora la potencia en la posición X^{38}) se combinan preferiblemente para resolver más de un problema y proporcionar los mejores polipéptidos. Asimismo, estos hallazgos también pueden aplicarse para mejorar los análogos peptídicos de la UCN2 en el estado de la técnica anterior, como se describe en los documentos WO 2023/285334, WO2018/013803 y WO2023/285347.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Procedimiento general para la síntesis de péptidos en fase sólida

Los péptidos se sintetizaron utilizando un sintetizador de péptidos paralelo totalmente automatizado Syroll (MultiSynTech GmbH, Alemania), equipado con un bloque calefactor, sobre Tentagel S RAM con una carga de 0.23-0.25 mmol/g (Rapp polymer GmbH, Alemania). La desprotección de N^{α} -Fmoc se realizó en dos etapas tratando la resina con 40% de piperidina/DMF (0.2 M HOBt (1-hidroxibenzotriazol)) durante 3 min a 45°C seguido de 20% de piperidina/DMF (0.1 M HOBt) durante 7 min a 75°C. Excepto los residuos de Asp, Cys e His, que fueron desprotegidos con N^{α} -Fmoc a temperatura ambiente, es decir, 40% de piperidina/DMF (0.2 M HOBt) durante 3 min seguido de 20% de piperidina/DMF (0.1 M HOBt) durante 15 min. La química de acoplamiento fue DIC (N,N'-diisopropil-carbodiimida)/Oxyma (ciano(hidroxiimino)acetato de etilo) en DMF usando soluciones de aminoácidos de 0.5 M en DMF y un exceso molar de 5 veces. Se usaron aminoácidos protegidos con Fmoc estándar. Las condiciones de acoplamiento fueron acoplamientos simples o dobles durante 15 min a 75°C. Excepto los residuos de His y Cys, que se acoplaron doblemente durante 15 min a 50°C. También los aminoácidos acoplados después de Aib se acoplaron doblemente. Los aminoácidos Fmoc se disolvieron a 0.5 M en DMF que contenía 0.5 M de Oxyma, excepto His que se disolvió en NMP. La resina se lavó 5 veces con DMF después de la desprotección de N^{α} -Fmoc y 3 veces después de los acoplamientos.

Para los ejemplos lipidados en el extremo N-terminal, la lipidación se realizó en resina como último paso en la síntesis del péptido. Los péptidos lipidados en el extremo N-terminal contenían opcionalmente residuos de enlace, como [γE], [OEG], [OEG]-[OEG], etc. Los residuos de enlace se introdujeron acoplando Fmoc-OEG-OH, Fmoc-OEG-OEG y/o Fmoc-Glu-OtBu al aminoácido N-terminal que alargaba el péptido antes de acoplar el diácido graso, como los diácidos grasos protegidos con terc-butilo, como el tBu-C18-diácido, el tBu-C20-diácido, etc. Los residuos de enlace se acoplaron doble o triplemente utilizando condiciones estándar. El ácido graso se acopló doblemente utilizando 2 eq. del bloque de construcción.

Para otros ejemplos lipidados, se incorporó un aminoácido protegido con Boc como residuo N-terminal, y la posición de lipidación se incorporó como lisina protegida ortogonal, en este caso Lys(Mtt). El grupo Mtt (4-metil-tritilo) se eliminó tratando la resina con HFIP al 75% (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-propan-2-ol)

en DCM (diclorometano) más TIPS al 5% durante 10 minutos. El procedimiento se repitió 3 veces. La resina se lavó con DIPEA al 10% en DCM, seguido de 3 lavados con DMF.

Los péptidos lipidados contienen opcionalmente uno o más residuos de enlace. Este(os) residuo(s) de enlace se acoplaron al grupo épsilon-amino de la lisina desprotegida antes del acoplamiento del ácido graso, como los diácidos grasos protegidos con terc-butilo, como el tBu-C18-diácido, el tBu-C20-diácido, etc. Los residuos de enlace se acoplaron doble o triplemente utilizando condiciones estándar. El ácido graso se acopló doblemente utilizando 2 equivalentes de bloque de construcción.

Para la síntesis de los péptidos de biblioteca:

Tras la síntesis, la resina se lavó con DCM y se secó. El polipéptido se separó de la resina mediante un tratamiento de 45-60 min con TFA (ácido trifluoroacético)/TES (triethylsilano)/DODT (2,2'-(etilenodioxo)di-*n*-octanol)/agua (93/2.5/2.5/2.0) a 40°C, seguido de precipitación con 3 volúmenes de éter dietílico frío, lavado adicional con éter dietílico y secado. Los péptidos se caracterizaron mediante LC-MS (Waters, Dinamarca) y se cuantificaron mediante LC-CAD (ThermoFisher Scientific, Dinamarca). Finalmente, los péptidos se liofilizaron utilizando un liofilizador de sobremesa Telstar.

Para purificar los péptidos:

Después de la síntesis, la resina se lavó con DCM y se secó, y el polipéptido se separó de la resina mediante un tratamiento de 120 min con TFA (ácido trifluoroacético)/TES (triethylsilano)/DODT (2,2'-(etilenodioxo)di-*n*-octanol)/agua (93/2.5/2.5/2.0) a 40°C, seguido de precipitación con éter dietílico frío, lavado adicional con éter dietílico y secado. Los péptidos se disolvieron en acetonitrilo/agua y se purificaron mediante HPLC de fase inversa utilizando un sistema Waters preparativo HPLC con columna C18 (Reprosil Gold 200 Å, 5 µm, 40 mm × 250 mm), bombas preparativas (Waters 2545), detector UV/VIS (Waters 2489) y colector de fracciones Waters III. La fase móvil se realizó con un gradiente de amortiguador A (TFA al 0.1% en H₂O) y amortiguador B (TFA al 0.1% en acetonitrilo) a un flujo de 40 mL/min a temperatura ambiente. Las fracciones relevantes se analizaron, se agruparon y se liofilizaron. Finalmente, los péptidos se liofilizaron utilizando un liofilizador de sobremesa Telstar.

La pureza y la masa de los péptidos se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa acoplada a espectrometría de masas (RP-HPLC-MS) analítica en una columna ACQUITY UPLC Peptide CSH C18 (Waters, ACQUITY UPLC Peptide CSH, C18, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X100 mm) utilizando un sistema Waters Acquity HPLC equipado con un detector de masas 3100. El análisis se realizó mediante elución por gradiente con el amortiguador A (0.3% de TFA en H₂O) y el amortiguador B (0.3% de TFA en acetonitrilo) a una temperatura de 40°C (los gradientes utilizados fueron del 40 al 60% de B durante 14 min, o del 50 al 70% de B durante 14 min).

Procedimiento general para la determinación de la potencia de hCRHR1

Ensayo de cAMP HTRF (CisBio): La tecnología del ensayo se describe detalladamente en el manual del kit de ensayo de cAMP HTRF de CisBio (# 62AM4PEC). En resumen, se aplicó la técnica de fluorescencia resuelta en el tiempo para medir el cAMP. Esta técnica se basa en un inmunoensayo competitivo que utiliza un anticuerpo anti-cAMP marcado con criptato y cAMP marcado con d2. En ausencia

de cAMP celular, el conjugado de criptato anti-cAMP puede acercarse al conjugado cAMP-d2 y transferirse energía (FRET) del criptato al d2.

Se utilizaron células CHO-K1 que expresan de forma estable el receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina humana (líneas celulares monoclonales estables hCRHR1 de Eurofins/DiscoverX Cat #95-0047C2) como células en suspensión, activadas a partir de reservas de células congeladas inmediatamente antes de la realización del ensayo. Se aplicaron formatos de ensayo de 384 pocillos (Corning, #4513) con un volumen total de ensayo de 20 μ l y las células (2000 células/pocillo) se incubaron con agonistas peptídicos durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando DPBS (Sigma, #D8537) que contenía 0.5 mM de IBMX (Sigma, #I5879) y 0.05% de caseína (Sigma, #C4765-10ml) como amortiguador de estimulación. Tras la adición de los reactivos de detección HTRF® y la incubación durante 1 hora en un agitador de placas (2400 rpm), se detectaron señales a 620 y 665 nm (recuentos brutos: relación de 665/620) en un lector de placas ClarioStar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

Para las bibliotecas de péptidos:

Se realizó una evaluación de la relación concentración-respuesta de los compuestos con 5 concentraciones de péptidos agonistas y se calcularon los valores de EC50 mediante regresión no lineal utilizando una curva sigmoidea de concentración-respuesta con pendiente variable.

Para péptidos purificados:

Se realizó una evaluación de la relación concentración-respuesta de los compuestos con 11 concentraciones de péptidos agonistas y se calcularon los valores de EC50 mediante regresión no lineal utilizando una curva sigmoidea de concentración-respuesta con pendiente variable.

Procedimiento general para la determinación de la potencia de hCRHR2.

Ensayo de cAMP HTRF (CisBio): La tecnología del ensayo se describe detalladamente en el manual del kit de ensayo de cAMP HTRF de CisBio (No. 62AM4PEC). En resumen, se aplicó la técnica de fluorescencia resuelta en el tiempo para medir el cAMP. Esta técnica se basa en un inmunoensayo competitivo que utiliza un anticuerpo anti-cAMP marcado con criptato y cAMP marcado con d2. En ausencia de cAMP celular, el conjugado de criptato anti-cAMP puede acercarse al conjugado cAMP-d2 y transferirse energía (FRET) del criptato al d2.

Se utilizaron células CHO-K1 que expresan de forma estable el receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina humana (Eurofins/DiscoverX, Cat #95-0048C2, líneas celulares monoclonales estables hCRHR2) como células en suspensión, activadas a partir de reservas de células congeladas inmediatamente antes de la realización del ensayo. Se aplicaron formatos de ensayo de 384 pocillos (Corning, #4513) con un volumen total de ensayo de 20 μ l y las células (2000 células/pocillo) se incubaron con agonistas peptídicos durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando DPBS (Sigma, #D8537) que contenía 0.5 mM de IBMX (Sigma, #I5879) y 0.05% de caseína (Sigma, #C4765-10ml) como amortiguador de estimulación. Tras la adición de los reactivos de detección HTRF® y la incubación durante 1 hora en un agitador de placas (2400 rpm), se detectaron señales a 620 y 665 nm (recuentos brutos: relación de 665/620) en un lector de placas ClarioStar (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

Para bibliotecas de péptidos:

Se realizó una evaluación de la relación concentración-respuesta de los compuestos con 5 concentraciones de péptidos agonistas y se calcularon los valores de EC50 mediante regresión no lineal utilizando una curva sigmoidea de concentración-respuesta con pendiente variable.

Para péptidos purificados:

- 5 Se realizó una evaluación de la relación concentración-respuesta de los compuestos con 11 concentraciones de péptidos agonistas y se calcularon los valores de EC50 mediante regresión no lineal utilizando una curva sigmoidea de concentración-respuesta con pendiente variable.

Procedimiento general para la determinación de la turbidez y la formación de fibrillas en péptidos de biblioteca.

- 10 Los péptidos se disolvieron en amortiguadores (fosfato de sodio 50 mM a pH 7.5) a 267 μ M y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se dividieron en dos réplicas de 80 μ l en una placa negra de 384 pocillos (μ -clear, Greiner Bio-One) y se mezclaron con tioflavina T (ThT) a una concentración final de 4 μ M. La placa se centrifugó durante 2 min a 2000 rpm para eliminar las burbujas de aire, se selló y se colocó en un lector de placas (CLARIOstar, BMG). En primer lugar, se midió la turbidez
15 de las muestras como la absorbancia a 600 nm. En segundo lugar, se ajustó la temperatura del lector de placas a 40°C y se midió la fluorescencia cada 10 min durante 72 horas excitando la ThT a 450 nm y midiendo la emisión a 480 nm. Las muestras se sometieron a estrés agitando la placa a 700 rpm (lineal) durante cinco minutos antes de cada medición, y la formación de fibrillas se determinó como la emisión promedio para cada muestra.

20 Procedimiento general para la determinación de la formación de fibrillas en péptidos purificados

- Ensayo de formación de fibrillas de tioflavina T: Los péptidos se disolvieron a 267 μ M en amortiguador de fosfato 50 mM pH 7.5 durante 2 h a temperatura ambiente en una mesa de agitación. Las muestras se dividieron en tres réplicas de 80 μ l/pocillo y se mezclaron con 2 μ l/pocillo de tioflavina T (ThT) hasta una concentración final de 4 μ M de ThT en una microplaca negra de 384 pocillos con fondo
25 transparente (Greiner #781096). La placa se insertó en un lector de microplacas CLARIOstar Plus (BMG Labtech) y la formación de fibrillas se midió como un aumento en la emisión de fluorescencia a 480 nm (excitación a 450 nm) durante 96 h a 40°C con ciclos de 5 min de reposo y 5 min de agitación lineal a 700 rpm.

Procedimiento general para la determinación de la solubilidad de péptidos purificados.

- 30 Se probó la solubilidad en los siguientes vehículos: amortiguador de fosfato de 100 mM que facilita un pH objetivo de 6.5, 7.0 y 7.5. Las muestras se disolvieron directamente en la unidad de filtro sin jeringa Mini-UniPrep de 0.45 μ m (Whatman). Para la concentración deseada, como una concentración de 4000 μ M (aproximadamente 20 mg/mL), se disolvieron 1600 nmol de péptido en 400 μ L de vehículo. Las muestras se incubaron durante al menos 1 h a temperatura ambiente en una mesa de agitación. Se midió
35 y ajustó el pH. Las muestras se dejaron en la mesa de agitación durante una hora adicional antes de una segunda medición y ajuste del pH. Se realizó una inspección visual y se registró antes de empujar el filtro. La concentración de péptido en el filtrado se determinó utilizando CAD (detección de aerosol cargado), se realizó una determinación doble para cada muestra. La concentración medida se informó en μ M. Además,

se midió y se informó el pH del filtrado. Los péptidos cuya concentración medida se encuentre dentro de un margen de +/-20% de la concentración objetivo se consideran totalmente solubles.

Procedimiento general para la determinación de la estabilidad química de los péptidos de la biblioteca

Se evaluó la estabilidad química a una concentración de 267 μ M de péptido en los siguientes vehículos: amortiguador de fosfato 50 mM a pH 7.5 y 8.0. Las muestras disueltas se incubaron durante al menos 2 h a temperatura ambiente en una mesa de agitación. La pureza del pico principal en el tiempo cero (T0) se determinó mediante cromatografía de fase inversa acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. Las muestras se incubaron a 40°C durante 7 días (T7) y 14 días (T14). Las muestras se analizaron mediante cromatografía de fase inversa acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.

Se realizó cromatografía de fase inversa acoplada a espectrometría de masas en un sistema UHPLC en tándem Thermo Vanquish equipado con una columna Acquity BEH (1.7 μ m, C18, 130 Å, 50 X 2.1 mm (Waters, 186002350)) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Thermo Exploris 120. El análisis se realizó mediante elución por gradiente con amortiguador A (ácido fórmico al 0.1% en H₂O) y amortiguador B (ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo) a una temperatura de columna de 40°C con un gradiente de 5-70% B en 7.5 min a un caudal de 0.4 mL/min. El espectrómetro de masas se operó en modo de adquisición dependiente de datos a una resolución MS1 de 60,000 y una resolución MS2 de 30,000 en modo positivo (Top4). Los péptidos se fragmentaron con una energía de colisión normalizada del 25%. Los péptidos se cuantificaron en función del cromatograma de iones extraídos (EIC) de su pico isotópico más alto. El péptido intacto se determinó a partir del cromatograma integrado como el área bajo el pico principal en relación con el área total del pico. La pérdida de pureza se calculó como la diferencia entre los puntos de tiempo T0 y T7 y/o como la diferencia entre los puntos de tiempo T0 y T14.

Procedimiento general para la determinación de la estabilidad química de péptidos purificados

Se evaluó la estabilidad química a una concentración aproximada de 1.0 mg/ml de péptido en el siguiente vehículo: amortiguador de fosfato 50 mM, pH 7.5. Las muestras disueltas se incubaron durante al menos 2 horas a temperatura ambiente en una mesa de agitación. La pureza del pico principal en el tiempo cero (T0) se determinó mediante cromatografía de fase inversa. Las muestras se incubaron a 40°C durante 14 días (T14) y 28 días (T28). Las muestras se analizaron mediante cromatografía de fase inversa y cromatografía de exclusión por tamaño.

La cromatografía de fase inversa se realizó en un sistema UHPLC Thermo Dionex Ultimate con detección UV a 215 nm) y equipado con una columna Kinetex (1.7 μ m, C8, 100 Å, 150 X 2.1 mm (00F-4499-AN)). El análisis se realizó mediante elución por gradiente con el amortiguador A (0.1% de TFA en 95:5 H₂O:acetonitrilo) y el amortiguador B (0.1% de TFA en 5:95 H₂O:acetonitrilo) a una temperatura de columna de 50°C (gradiente utilizado 25-55% B durante 40 min). El caudal fue de 0.5 mL/min. La pureza del pico principal se determinó a partir del cromatograma integrado como el área bajo el pico principal en relación con el área total del pico. La pérdida de pureza se calculó como la diferencia entre el punto de tiempo T0 y T14 y/o como la diferencia entre el punto de tiempo T0 y T28.

Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) como método de análisis para la formación de productos de alto peso molecular (HMWP, dímeros covalentes, trímeros, etc.). Los análisis SEC se

realizaron en un sistema UHPLC Thermo Dionex Ultimate con detección UV a 215 nm) equipado con una columna SEC (Waters BEH 125Å, 1.7 µm, 300 mm X 4.6). El análisis se realizó mediante elución isocrática utilizando 60% de amortiguador B (0.1% de TFA en 5:95 H₂O:acetonitrilo) en amortiguador A (0.1% de TFA en 95:5 H₂O:acetonitrilo) a una temperatura de columna de 60°C durante 20 min. El caudal fue de 0.3 mL/min.

Los cromatogramas se integraron como HMWP (todos los picos que eluyen antes del pico principal), pico principal (suponiendo que se trata de un péptido monomérico) y, si correspondía, LMWP (productos de bajo peso molecular, todos los picos que eluyen después del pico principal). La cantidad de HMWP se expresó como área relativa al área total en porcentaje.

Estudios de dispersión dinámica de luz (DLS) sobre la oligomerización de péptidos y la formación de partículas.

Las muestras se prepararon disolviendo 800 nmol de cada péptido en 400 µl de fosfato 50 mM a pH 8.0 hasta alcanzar una concentración de 2000 µM (aprox. 10 mg/ml). Tras la disolución completa durante 2 horas en una mesa de agitación, las muestras se ajustaron a pH 7.5 y se filtraron a través de un filtro Whatman Anotop de 0.2 µm. Como comparadores se utilizaron el fármaco comercial liraglutida (Victoza®, Novo Nordisk) a pH 8.2 y una alícuota de este fármaco ajustada a pH 6.7. Estas muestras se filtraron a través de un filtro Whatman Anotop de 0.02 µm.

Las muestras se pipetearon por triplicado en dosis de 30 µl en una placa de microtitulación Aurora de 384 pocillos, que se centrifugó durante 2 minutos a 2200 rpm y luego se selló con una cinta de sellado Thermo 235307. Las mediciones de DLS se realizaron en un lector de placas Wyatt DynaPro III con los siguientes parámetros:

Parámetro	Valor
Tiempo de adquisición de DLS	10 segundos
Adquisiciones de DLS por medición	10
Mediciones por pozo dentro de un escaneo	1
Número de escaneos	1
Temperatura inicial	25°C
Sellador de placas	Cinta de sellado
Temperatura de ajuste	25°C
Láser encendido	Sí

La placa de microtitulación se incubó en un agitador térmico Grant-bio Thermo Shaker PHMP-4 a 40°C con agitación continua a 700 rpm antes de las mediciones DLS posteriores. El análisis de datos se realizó utilizando el software Wyatt Dynamics versión 7.10.1.21.

Farmacodinámica (PK) en ratones

Se obtuvieron ratones macho delgados NMRI/RjHan de JanVier (JanVier Labs, Francia) a las 6 semanas de edad. Los animales se alojaron individualmente bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con la luz apagada a las 15:00 h. La temperatura ambiente se controló a 22°C ± 1°C, con una humedad del

60% $\pm$ 20%. Los animales tuvieron acceso libre a alimento estándar para roedores (Altromin 1324, Brogaarden, Dinamarca) y agua del grifo.

Tras dos semanas de aclimatación, los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento (n=9 por grupo) según su peso corporal. Se administró a los animales una dosis intravenosa de un péptido y una dosis subcutánea de otro (15 o 50 nmol/kg). Se recolectaron muestras de plasma para análisis farmacocinético a las 0.17, 1, 3, 6, 24, 30, 48, 72 y 96 horas posteriores a la administración, utilizando un diseño de muestreo disperso con 3 ratones por grupo y por punto temporal. Las muestras de plasma se analizaron mediante LC-MS/MS y los parámetros farmacocinéticos se estimaron mediante análisis no compartimental (NCA).

PK en ratas

Se obtuvieron ratas macho Sprague Dawley delgadas (RJHan:SD) de JanVier (JanVier Labs, Francia) a las 7 semanas de edad. Los animales se alojaron en parejas hasta su aleatorización bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con la luz apagada a las 15:00 h. La temperatura ambiente se controló a 22°C $\pm$ 1°C, con una humedad del 60% $\pm$ 20%. Los animales tuvieron acceso libre a alimento estándar para roedores (Altromin 1324, Brogaarden, Dinamarca) y agua del grifo.

Tras dos semanas de aclimatación, los animales fueron alojados individualmente y asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento (n=3 por grupo) según su peso corporal el día -3 del estudio. El día 1 del estudio, se administró a los animales una dosis de 50 nmol/kg por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) en combinación de dos péptidos. Se tomaron muestras de plasma para el análisis farmacocinético a las 0.17, 1, 3, 6, 24, 30, 48, 72 y 96 horas posteriores a la administración. Las muestras de plasma se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y los parámetros farmacocinéticos se estimaron mediante análisis no compartimental (NCA).

PK en minicerdos

Se realizaron estudios farmacocinéticos en minicerdos machos de la raza Göttingen, procedentes de Ellegaard Göttingen Minipigs A/S. Los animales se aclimataron durante al menos 7 días antes de participar en el estudio. Previamente, a los minicerdos se les implantaron quirúrgicamente catéteres venosos centrales para la toma de muestras de sangre. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, con acceso libre a agua potable, y se les alimentó dos veces al día con una dieta comercial estándar de mantenimiento.

Los compuestos de prueba se administraron como un casete o como un compuesto individual. Los compuestos de prueba se administraron mediante una única inyección intravenosa o infusión corta (5-10 min) a través del catéter implantado o una única inyección subcutánea. La inyección subcutánea se administró en la parte media del cuello entre la oreja y la escápula con un tope en la aguja, lo que permitió insertar 0.5 cm de la aguja. Se obtuvieron perfiles de concentración plasmática-tiempo empleando 12-16 puntos de muestreo de cada animal. Como ejemplo, se recolectaron muestras de sangre en los siguientes tiempos: 0 (antes de la dosis), 0.17, 0.33, 0.5, 1, 2, 5, 6, 24, 48, 72, 92, 168, 240 y 336 horas después de la administración.

Se extrajeron aproximadamente 2 ml de sangre del catéter central de cada animal en cada punto de muestreo. Las muestras de sangre se tomaron en tubos con EDTA K2 o K3. La sangre se mantuvo en

helo durante un máximo de 30 minutos antes de la centrifugación (10 minutos, 4°C, 2000 x g). Aproximadamente 200 µl de plasma se transfirieron a un tubo Micronic y se almacenaron a -20°C o menos.

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante análisis no compartimental (ANC) del perfil individual de concentración plasmática-tiempo de los animales. Se utilizó el método trapezoidal logarítmico lineal para la estimación del AUC y el AUMC. La $T_{1/2}$ terminal se determinó como $\ln(2)/\lambda_z$, donde λ_z es la constante de velocidad de primer orden determinada por la parte logarítmica lineal terminal de la curva.

Las concentraciones plasmáticas se midieron mediante LC-MS/MS utilizando ionización por electroaspersión y monitorización de reacciones múltiples. Los estándares de calibración y las muestras de control de calidad (CC) se prepararon en una matriz de coincidencia de especies. Se extrajeron 15 µL de los estándares de calibración, las muestras de CC y las muestras de estudio mediante precipitación de proteínas utilizando 60 µL de metanol seguido de la adición de 45 µL de agua Milli-Q. Las muestras se agitaron (800 rpm) a temperatura ambiente durante 5 min antes de la centrifugación (2570×g, 40 min, 4°C) y el sobrenadante se transfirió a una placa de PCR LoBind. Las muestras se analizaron en un sistema UHPLC Thermo Triscend acoplado a un espectrómetro de masas Sciex API 6500+. Las muestras se sometieron a una limpieza SPE en línea en una columna HLB (1×50 mm, Waters) antes de cargarlas en una columna analítica Aeris Peptide XB C18 (3.6 µm, 100 Å, 2×50 mm, Phenomenex). Las fases móviles consistieron en acetonitrilo y agua Milli-Q, ambas con un 0.1% v/v de ácido fórmico. El caudal fue de 0.60 mL/min y la columna se mantuvo a temperatura ambiente.

Efecto sobre la ingesta de alimentos

Se obtuvieron ratones NMRI machos de JanVier (JanVier Labs, Francia) a las 5 semanas de edad. Los animales se alojaron en grupos de 4 ratones por jaula bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con la luz apagada a la 1 PM. La temperatura ambiente se controló a 22°C ± 0.5°C, con una humedad del 60% ± 20%. Los animales tuvieron acceso libre a alimento estándar para roedores (Altromin 1324, Brogaarden, Dinamarca) y agua del grifo.

Los animales fueron transferidos 5-7 días antes del inicio del estudio a un sistema de monitoreo de ingesta de alimentos en tiempo real, sistema HM-2 (MBRose, Dinamarca) para permitir la aclimatación a las condiciones experimentales. Como los animales fueron identificados de forma única con microchips, cada animal individual fue identificado por su microchip al entrar y salir del canal de alimentos. La aleatorización de los ratones para cada grupo de estudio (n=7-8) se basó en el peso corporal medido el día anterior al inicio del estudio. Se incluyó un grupo tratado con vehículo en cada experimento. Seis horas antes del inicio de la fase oscura, los animales fueron sometidos a ayuno. Una hora antes de la fase oscura, los animales recibieron una dosis única subcutánea del péptido de prueba. La ingesta de alimentos se registró cada hora durante un período de 72 horas. El porcentaje de reducción de la ingesta de alimentos se normalizó con respecto a la ingesta promedio de alimentos del grupo vehículo. La significancia estadística se evaluó mediante análisis de varianza unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Efecto sobre la masa corporal y el contenido de grasa corporal en un modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta (OID).

Se evaluó la capacidad de las secuencias SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 215 para reducir la masa corporal y el contenido de grasa corporal en un modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta (DIO).

Se obtuvieron ratones macho C57BL/6JRj de JanVier (JanVier Labs, Francia) a las 5 semanas de edad. Los animales se alojaron en grupo durante la inducción de la obesidad y luego individualmente 2 semanas antes del inicio del estudio. Se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con la luz apagada a las 3 PM. La temperatura ambiente se controló a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con una humedad del $60\% \pm 20\%$. Durante 22-23 semanas antes del inicio del tratamiento y durante todo el estudio, los animales tuvieron acceso libre a una dieta alta en grasas (60% de kcal de grasa, D12492, Research Diets) y agua del grifo.

Los animales fueron asignados aleatoriamente según la masa magra (EchoMRI) y el peso corporal. Los animales recibieron una dosis subcutánea una vez durante 30-32 días. En el estudio 1, los animales recibieron el vehículo o SEQ ID NO: 3 (10, 30, 60 o 100 nmol/kg). En el estudio 2, los animales recibieron el vehículo o SEQ ID NO: 6 (10 o 30 nmol/kg), SEQ ID NO: 238 (10 o 30 nmol/kg), SEQ ID NO: 16 (10 o 30 nmol/kg), SEQ ID NO: 215 (10 o 30 nmol/kg) o SEQ ID NO: 3 (30 nmol/kg).

El peso corporal y la ingesta de alimentos se registraron diariamente hasta el día 28, y la composición corporal se evaluó el día 26 mediante resonancia magnética ecocardiográfica (EchoMRI). Al finalizar el estudio, se extrajo sangre para análisis de HbA1c y se pesaron los músculos gastrocnemio y sóleo.

La significancia estadística se evaluó mediante un análisis de varianza unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Telemetría en ratones

La presión arterial y la frecuencia cardíaca se monitorizaron en ratones conscientes en libre movimiento mediante radiotelemetría (PA-C10, Data Sciences). Brevemente, se realizó analgesia con metamizol (100 mg/kg sc). Para la implantación del transmisor de telemetría, los animales fueron anestesiados con isoflurano al 5% para la inducción y al 2% para el mantenimiento. Se abrió el cuello en la zona del hueso hioides hasta el esternón en la línea media. Se preparó un bolsillo subcutáneo para alojar el transmisor. A continuación, se expuso la arteria carótida derecha mediante disección roma y se pinzó. El transmisor se introdujo caudalmente en la arteria carótida a través de una incisión. El catéter se fijó con un hilo de prolene de monofilamento, que también cerró la incisión. El vaso también se ligó cranealmente y se retiró la pinza. El alojamiento del transmisor se introdujo subcutáneamente en un bolsillo de piel preparado en el lado opuesto al catéter. Finalmente, se cerró la herida cutánea. En el postoperatorio, se administró un antibiótico (Ursocyclin® 10, Serumwerk Bernburg AG, Alemania; 400 mg/l de agua potable durante 10 días) y un analgésico (Rimadyl®, 4 mg/kg por vía subcutánea durante 3 días).

Para las mediciones de la presión arterial, los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h:12 h en una habitación adecuada durante al menos un día antes de la primera medición. A los animales se les administró por vía subcutánea una vez al día por la mañana durante 7 días consecutivos con 1) Placebo, 2) SEQ ID NO: 3, 10 nmol/kg, 3) SEQ ID NO: 3, 30 nmol/kg o 4) SEQ ID NO: 3, 100 nmol/kg en un diseño cruzado con 2 animales por grupo ($n=6-8$) por semana y con 1 semana de lavado entre

tratamientos. La medición telemétrica se realizó durante 24 horas. Los datos promediados (cuadrícula de 1 min a 10 min) se mostraron gráficamente.

Para el análisis estadístico, se calcularon promedios de 5 horas, comenzando una hora después de la administración de la dosis y una hora después de apagar las luces. Todos los datos se evaluaron mediante un ANOVA de dos vías con la prueba de Dunnett.

Telemetría en ratas

La presión arterial y la frecuencia cardíaca se monitorizaron en animales conscientes y en libre movimiento mediante radiometría (DSI Data Science International, MN, EUA). Se implantaron transmisores en ratas hipertensas adultas hembras (SHR). Tras rasurar la pared abdominal, se realizó una incisión abdominal en la línea media y se insertó el catéter sensor lleno de líquido aguas arriba en la aorta descendente expuesta entre la bifurcación ilíaca y las arterias renales. Según las directrices de DSI, la punta del catéter telemétrico se ubicó justo al caudal a las arterias renales y se fijó con adhesivo tisular. El cuerpo del transmisor se fijó a la pared peritoneal interna - 3 - antes del cierre del abdomen. Se utilizó un cierre de dos capas de la incisión abdominal, con sutura individual del peritoneo y la pared muscular seguida del cierre de la piel externa. La cirugía se realizó en condiciones asépticas. Para la protección postoperatoria contra infecciones y dolor, se administró una dosis única de antibiótico (Ursocyclin 10% pro inj., Serumwerk, sc) y analgésico (Rimadyl®, 4 mg/kg sc, Pfizer, Alemania). Todos los animales se alojaron individualmente a una temperatura ambiente de 22-24°C y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h con libre acceso a alimento estándar para ratas de laboratorio y agua *ad libitum*.

Todos los animales fueron tratados con dosis diarias subcutáneas de vehículo o SEQ ID NO: 3 (10 o 30 nmol/kg) durante 7 días (1 ml/kg). La administración del fármaco se realizó a las 9:00 a. m. (=0 horas). Para el análisis, los datos se agruparon para obtener promedios cada media hora.

Para el análisis estadístico, se calcularon las medias de 24 horas a partir del momento de la administración de la dosis. Todos los datos se evaluaron mediante un análisis de varianza bidireccional (ANOVA) con la prueba de Dunnett.

Telemetría en cerdos

Las propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y de seguridad de la SEQ ID NO: 3 se evaluaron mediante radiometría en cerdos sanos, conscientes y en libre movimiento.

En la parte A del estudio, se compararon los efectos de un régimen de dosis crecientes de la SEQ ID NO: 3 (0.03, 0.1, 0.3 y 1.0 mg/kg) con placebo. Los criterios de valoración principales fueron la presión arterial, la frecuencia cardíaca y las mediciones del ECG.

En la parte B del estudio, se comparó el efecto de la administración repetida (una vez por semana durante 4 semanas) de una dosis única de la SEQ ID NO: 3 (0.3 mg/kg) con el de un placebo. Los criterios de valoración principales fueron la presión arterial, la frecuencia cardíaca y las mediciones del ECG.

Efectos agudos de un péptido seleccionado sobre la hemodinámica en cerdos anestesiados.

Se anestesiaron minicerdos de Göttingen y se les implantaron instrumentos para monitorizar continuamente la hemodinámica durante la medición basal (0.5 h), el tratamiento con vehículo (0.5 h) y

dosis crecientes de la SEQ ID NO: 215 cada 0.5 horas (10, 30, 100 y 300 µg/kg/min), y se compararon con una configuración similar utilizando dobutamina (1, 3, 10 y 20 µg/kg/min) y vehículo (NaCl).

Modelo de isquemia miocárdica en ratas

Se obtuvieron ratas Wistar macho de Janvier (Janvier Labs, Francia) a las 6 semanas de edad.

- 5 Los animales se alojaron en parejas. Durante el estudio, los animales tuvieron libre acceso a alimento (RM1, SDS Dietex) y agua potable *ad libitum*.

El infarto de miocardio (IM) se indujo mediante la ligadura crónica de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) realizada el día cero. Los animales del grupo control (sometidos a cirugía simulada) fueron sometidos al mismo protocolo; tras la toracotomía lateral izquierda que exponía el
10 corazón, se cerró la caja torácica sin pasar el hilo de sutura alrededor de la DAI.

Los tratamientos comenzaron un mes después del infarto de miocardio, con el fin de evaluar el posible efecto beneficioso del compuesto candidato para prevenir la progresión de la patología.

Se realizó un examen ecocardiográfico transtorácico (ECG) a ratas para evaluar la morfología y la función cardíacas de forma no invasiva. La ecocardiografía se llevó a cabo utilizando un sistema de
15 ultrasonido digital (Vivid S60, GE Medical Systems) equipado con un transductor de matriz de fase de 12 MHz y un transductor de matriz lineal de 18 MHz. Se obtuvieron imágenes estándar en modo B (modo de brillo) y modo M (modo de movimiento) del corazón en la vista paraesternal de eje largo bidimensional (2D). Los parámetros del ventrículo izquierdo (VI) se midieron y calcularon como la media de 3 ciclos cardíacos consecutivos por un único operador capacitado y ciego.

20 Se realizaron un total de cuatro exámenes de ECG para todos los animales. El primer examen se realizó 5-7 días después de la cirugía y se utilizó como control de la cirugía. El segundo ECG se realizó 1 mes después de la ligadura de la LAD. Con base en el segundo ECG, las ratas con MI incluidas se asignaron aleatoriamente a 4 grupos homogéneos según el diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole (LVIDd), el volumen telediastólico (TeleD), la fracción de eyección (FE) y el acortamiento fraccional (FS): Grupo 1 (Simulado): n=10, grupo 2 (MI/Vehículo): n=19, grupo 3 (MI/Atenolol-Lisinopril-Espironolactona (A+L+S) 1-1-10 mg/kg): n=19, grupo 4 (MI/péptido de prueba 30 nmol/kg): n=19 y grupo 5 (MI/péptido de prueba 100 nmol/kg): n=19. El vehículo y el péptido de prueba se administraron diariamente por vía subcutánea, y A+L+S se administraron a través del agua potable.
25

El tercer y cuarto electrocardiograma (ECG) se realizaron 2 y 3 meses después de la cirugía y se
30 utilizaron para evaluar la remodelación y la función cardíacas tras el infarto de miocardio. En el cuarto ECG también se evaluaron el tiempo de relajación isovolumétrica (TRIV) y el gasto cardíaco (GC) mediante ecocardiografía Doppler.

Antes de finalizar el procedimiento, se realizaron mediciones hemodinámicas bajo anestesia utilizando un catéter lleno de líquido (BLPR y TBM4m, World Precision Instrument). Al finalizar, se disecó
35 y pesó el músculo sóleo izquierdo.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad 9. Si los valores presentaban una distribución normal, se realizó un análisis paramétrico. Si las muestras provenían de poblaciones con distribución no normal, se realizó un análisis no paramétrico. En primer lugar, se evaluaron las diferencias entre el grupo control (Simulado) y el grupo con infarto de miocardio (IM/Vehículo) mediante una prueba t.

Posteriormente, se compararon los grupos con IM tratados con el grupo IM/Vehículo mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc correspondiente.

IRI Subcrónico

Se obtuvieron ratones macho C57BL/6jRj de JanVier (JanVier Labs, Francia) a las 10 semanas de edad. Los animales se alojaron individualmente en jaulas ventiladas individualmente (IVC de Tecniplast, jaula tipo I SL) con libre acceso a agua, alimento y enriquecimiento ambiental. Se permitió que los animales se aclimataran durante 7 días antes del inicio del estudio. Después de la aclimatación, los animales se asignaron aleatoriamente a grupos según su peso corporal: 1) Control (Simulado), 2) uIRI – Vehículo, 3) uIRI – SEQ ID NO: 3, 30 nmol/kg y 4) uIRI – SEQ ID NO: 3, 100 nmol/kg.

En el día 0 del estudio, se realizó una lesión de isquemia-reperfusión unilateral (uIRI, 25 min de oclusión seguida de perfusión) en el grupo de estudio 2 a 4 (seguido de una nefrectomía unilateral (UNx) en el día 6 del estudio. Los animales recibieron una dosis subcutánea una vez al día comenzando antes de la cirugía de IRI y hasta el día 7 del estudio, donde se les dio por terminado el experimento. En este punto se recolectó plasma, y el riñón restante se pesó y se tomaron muestras para análisis histológico. Los riñones se tiñeron, analizaron y cuantificaron utilizando los siguientes marcadores: colágeno tipo 1 (col1a1), F4/80 y KIM-1.

Ejemplo 1: Análisis de glutamato: exploración de la solubilidad y la potencia de hCRHR2/hCRHR1.

Para identificar los sitios óptimos para mejorar la solubilidad, sin afectar negativamente la potencia y selectividad de hCRHR2, se sintetizó una biblioteca de 190 péptidos, en los que se introdujeron de 1 a 6 residuos de glutamato en comparación con una versión lipidada de la UCN2 nativa (SEQ ID NO: 2).

Se determinaron los valores de EC50 en hCRHR2 y hCRHR1 y se calcularon los valores SHAP a partir de un modelo de bosque aleatorio, donde los valores de pEC50 se ajustaron a las secuencias de aminoácidos del péptido. Se utilizaron los valores delta medios SHAP para determinar el nivel de contribución de cada sustitución de glutamato en relación con el residuo UCN2 nativo en la potencia de hCRHR2 y hCRHR1 (Breiman, L. (2001), Random Forests, Machine Learning 45(1), 5-32.; Lundberg, SM, & Lee, SI (2017). A unified approach to interpreting model predictions. Advances in neural information processing systems, 30.). Las sustituciones con valores delta medios SHAP positivos aumentaron el punto final en relación con el residuo UCN2 nativo, mientras que los valores delta medios SHAP negativos disminuyeron el punto final en relación con el residuo UCN2 nativo. La Fig. 1 resume los resultados. Las posiciones X²¹, X²², X²⁴, X²⁵, X²⁶, X²⁷, X²⁸, X³³, X³⁵, X³⁶, X³⁹ y X⁴⁰ se identificaron como posiciones adecuadas para incorporar residuos de glutamato (E) para aumentar la solubilidad sin efectos adversos importantes sobre la potencia y selectividad de hCRHR2. En particular, las posiciones X²², X³³, X³⁶, X³⁹ y X⁴⁰ se identificaron como posiciones para incorporar residuos de glutamato para aumentar la solubilidad mientras se preserva o mejora la potencia y selectividad de hCRHR2. Las posiciones X³⁶ y X⁴⁰ se identificaron como las mejores posiciones para incorporar residuos de glutamato para aumentar la solubilidad con una mejora concomitante de la potencia de hCRHR2.

Ejemplo 2: Escaneo de lipidación: exploración del sitio de lipidación y la potencia de hCRHR2/hCRHR1.

Para identificar los sitios de lipidiación óptimos, se realizó un escaneo de lipidiación en la estructura principal de la UCN2 que tiene $X^{36}=E$ y $X^{40}=E$ (SEQ ID NO: 228), introduciendo varios residuos de lisina (K) lipidados en cada una de las posiciones X^4 - X^{41} . Se utilizaron las siguientes estrategias de lipidiación: C18DA- γ Glu, C18DA- γ Glu-OEG-OEG, C18DA- γ Glu- γ Glu-OEG-OEG, C20DA-gGlu, C20DA- γ Glu-OEG-OEG o C20DA- γ Glu- γ Glu-OEG-OEG.

La Fig. 2A muestra la potencia de hCRHR1 y hCRHR2 para cada sitio de lipidiación promediada en diferentes estrategias de lipidiación. Los sitios de lipidiación agrupados en la esquina superior izquierda de la Fig. 2A proporcionan la mayor potencia de hCRHR2 y la menor potencia de hCRHR1. La Fig. 2B representa la relación de selectividad para cada sitio de lipidiación para el hCRHR2 sobre el hCRHR1 (es decir, $hCRHR1\ EC_{50}/hCRHR2\ EC_{50}$) promediada en diferentes estrategias de lipidiación. La Fig. 2B muestra que las posiciones X^{20} , X^{25} , X^{27} , X^{28} , X^{29} , X^{32} , X^{33} y X^{40} se identificaron como los sitios más óptimos para la lipidiación, proporcionando la mayor relación de selectividad para el hCRHR2 sobre el hCRHR1. Preferiblemente, se utiliza X^{32} o X^{33} como sitio de lipidiación.

La Tabla 1 ilustra que la lipidiación en la posición X^{32} o X^{33} mantiene una alta potencia de hCRHR2 y proporciona una selectividad superior para hCRHR2 en comparación con la UCN2 nativa. La Tabla 1 demuestra además que los glutamatos (E), para una mayor solubilidad, en las posiciones más preferidas X^{36} y X^{40} mantienen una alta potencia de hCRHR2 y una alta selectividad para el hCRHR2 sobre el hCRHR1. Se encontró que la monometilación N-terminal de X^4 o la sustitución de $X^4=P$ tuvieron un impacto menor en la potencia de hCRHR2, siendo la monometilación N-terminal de X^4 , es decir, $X^4=Me$, la que menos impactó la potencia de hCRHR2. Además, los datos confirman que se puede lograr una alta solubilidad deseable incorporando al menos dos glutamatos en UCN2 lipidado. Se encontró que todos los péptidos no fibrilaban. Curiosamente, los péptidos SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 presentaron una selectividad mucho mayor que los péptidos de la técnica anterior SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 divulgados en los documentos WO 2018/013803 A1 y WO 2023/285334 A1. Esto demuestra que dos glutamatos en las posiciones X^{36} y X^{40} , para mejorar la solubilidad, junto con una lipidiación en la posición X^{32} o X^{33} , para alterar las propiedades farmacocinéticas, proporcionan una selectividad superior en comparación con los péptidos de la técnica anterior.

La Tabla 1 muestra además que la lipidiación en la posición X^{15} (SEQ ID NO: 261 en la Tabla 1) como se usa en el documento WO 2022/038179 A1 (en el presente documento posición X^{12}) proporcionó una potencia hCRHR2 deficiente.

Tabla 1								
SEQ ID NO.	Sustituciones en relación con la UCN2 nativa	hCRHR2 EC ₅₀ (nM)	hCRHR1 EC ₅₀ (nM)	Relación de selectividad (hCRHR1/hCRHR2)	Estabilidad química a pH 7.5 después de 14 días/28 días a 40°C (% de degradación)	Fibrilación (pH 7.5)	Solubilidad pH 7.5, concentración objetivo =5 mg/mL (medido en mg/mL)	Solubilidad pH 7.5, concentración objetivo =10 mg/mL (medido en mg/mL)
(UCN2 nativa) 1	-	0.24	220	917	ND	No	ND	ND
2	X ³² =K(lip)	1.8	>5000	>2778	ND	No	0.016	ND
3	X ³² =K(lip); X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E	1.1	>5000	>4546	-6.1 / -15	No	4.5	10
4	X ³³ =K(lip); X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E	1.3	>5000	>3846	-1.3 / -3.9	No	ND	9.1
5	X ⁴ =Mel; X ³² =K(lip); X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E	1.2	>5000	>4167	- 5.4 / ND	No	ND	11
6	X ⁴ =Mel; X ³³ =K(lip); X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E	2.7	>5000	>1852	-1.0 / -3.5	No	ND	11
7	X ⁴ =P; X ³² =K(lip); X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E	2.5	>5000	>2000	- 11 / -23	No	ND	9.8
8	X ⁴ =Acl; X ³² =K(lip); X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E	1.4	560	400	ND	ND	ND	ND
9	X ⁴ =Mel; X ²² =E; X ²³ =K; X ²⁴ =Q; X ²⁵ =E; X ²⁶ =K; X ²⁷ =E; X ²⁸ =K; X ²⁹ =Q; X ³² =K(lip); X ³⁶ =Q; X ⁴⁰ =Q	1.3	510	392	ND	ND	ND	ND
10	X ⁴ =Mel; X ⁶ =T; X ²² =E; X ²³ =K; X ²⁴ =Q; X ²⁵ =E; X ²⁶ =K; X ²⁷ =E; X ²⁸ =K; X ²⁹ =Q; X ³² =K(lip); X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =Q	0.49	68	139	ND	ND	ND	ND

Tabla 1 (cont.)								
11	X ³ =K(lip); X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E	1.6	670	419	ND	ND	ND	ND
260	N.term.= lip; X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E	1.4	110	79	ND	ND	ND	ND
261	X ¹⁵ =K(lip); X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E	24	>5000	>208	ND	ND	ND	ND

Ejemplo 3: Estabilidad química: identificación de sitios y sustituciones para mejorar la estabilidad química.

La posición X³⁴ se identificó como un residuo químicamente lábil en la estructura principal de la UCN2. Para mejorar la estabilidad química de los péptidos, se sintetizaron compuestos en los que se sustituyó el aminoácido treonina (T), presente en UCN2, en la posición X³³ o el aminoácido alanina (A), presente en UCN2, en la posición X³⁵ (véase la Tabla 2). El efecto de cada sustitución se muestra en relación con la referencia 1 (es decir, UCN2 con X³²=K(Lip); X³⁶ y X⁴⁰=E).

Tabla 2							
SEQ ID NO.:	Sustituciones relativas a la referencia 1	hCRHR2 EC ₅₀ (nM)	hCRHR1 EC ₅₀ (nM)	Relación de selectividad (hCRHR1/ hCRHR2)	Estabilidad química a pH 7.5 después de 14 días/28 días a 40°C (% de degradación)	Fibrilación (pH 7.5)	Solubilidad pH 7.5, concentraci ón objetivo =10 mg/mL (medido en mg/mL)
3 (UCN2 lipidado con X ³⁶ =E; X ⁴⁰ =E) (referencia 1)	-	1.1	>5000	>4546	-6.1 / -15	No	10
12	X ³⁵ =L	4.4	>5000	>1136	-0.6 / -1.2	No	9.1
13	X ³⁵ =I	5.4	>5000	>926	-0.3 / -1.6	No	8.9
14	X ³⁵ =V	5.0	>5000	>1000	-0.3 / -1.2	No	9.2
15	X ³⁵ =Aib	2.3	>5000	>2174	-1.0 / -1.2	No	9.8
16	X ⁴ =Mel; X ³⁵ =Aib	2.7	>5000	>1852	-0.6 /	No	10
17	X ³³ =E	2.1	>5000	>2381	-1.6 / -2,6	No	9.2
18	X ⁴ =Mel; X ³³ =E	1.4	>5000	>3571	-2.2 / ND	No	11
19	X ³³ =Aib	1.6	>5000	>3125	-1.5 / -2.6	No	9.6
20	X ⁴ =Mel; X ³³ =Aib	1.2	>5000	>4167	-1.4 / ND	No	10
6	X ³² =T, X ³³ =K(Lip)	2.7	>5000	>1852	-1.0 / -3.5	No	9.8

Como se muestra en la Tabla 2, la sustitución del aminoácido alanina (A) en la posición X³⁵ por el aminoácido L, I, V o Aib, o la sustitución del aminoácido treonina (T) en la posición X³³ por E, Aib o K(Lip), resultó en una mejora significativa de la estabilidad química sin impacto en la potencia o con solo una ligera disminución de la potencia en comparación con la referencia 1. Además, todos los péptidos mantuvieron altos índices de selectividad superiores a los de la UCN2 nativa. Asimismo, los datos demuestran que se conserva una alta estabilidad física (es decir, sin fibrilación) y solubilidad al sustituir la posición X³³ o la posición X³⁵.

Por lo tanto, se prefiere mayormente que X³⁵ se seleccione como L, I, V o Aib para proporcionar análogos de la UCN2 con mayor estabilidad química. Alternativamente, se prefiere mayormente que X³³ se seleccione como E, Aib o K(Lip) para proporcionar análogos de la UCN2 con mayor estabilidad química.

Ejemplo 4: Mejora de la potencia de hCRHR2

Para identificar los sitios de mejora de la potencia de hCRHR2, se diseñó una biblioteca de 1140 péptidos. La biblioteca se basó en el análogo lipidado de la UCN2, referencia 1, SEQ ID NO: 3, y el objetivo fue mejorar la potencia optimizando (1) las interacciones del bolsillo de unión de hCRHR2 con diferentes residuos de aminoácidos en las posiciones X⁶, X¹⁰, X¹¹ y X¹², (2) la región de curvatura en UCN2 en la posición X²⁰⁻²⁷, o (3) la interfaz hCRHR2-ECD:UCN2 mediante la introducción de diferentes residuos de aminoácidos en las posiciones X²⁵⁻²⁷, X²⁹⁻³⁰, X³⁸ y X⁴¹. Los residuos de aminoácidos probados en cada posición se resumen en la Fig. 3.

Los valores de EC₅₀ en hCRHR2 y hCRHR1 se determinaron para cada biblioteca y los valores SHAP se calcularon a partir de un modelo de bosque aleatorio donde los valores de pEC₅₀ se ajustaron a las secuencias de aminoácidos del péptido. Los valores delta medios SHAP se utilizaron para determinar el nivel de contribución de cada sustitución de aminoácido en relación con el residuo UCN2 nativo correspondiente en la potencia de hCRHR2 y hCRHR1 (Breiman, L. (2001), *Random Forests, Machine Learning* 45(1), 5-32.; Lundberg, SM, & Lee, SI (2017). *A unified approach to interpreting model predictions. Advances in neural information processing systems*, 30.). Las sustituciones con valores delta medios SHAP positivos aumentaron el punto final en relación con el residuo UCN2 nativo, mientras que los valores delta medios SHAP negativos disminuyeron el punto final en relación con el residuo UCN2 nativo. La contribución de cada aminoácido se resume en la Fig. 3.

La Fig. 3 muestra que la mayoría de los aminoácidos probados dieron como resultado una potencia de hCRHR2 disminuida o sin cambios en relación con el residuo UCN2 nativo, con la excepción de las posiciones de aminoácidos X⁶, X¹⁰, X¹¹, X¹² y X³⁸, donde la treonina (T), la cicloleucina (Cle), la hidroxiprolina (Hyp), la leucina (L) y la norleucina (Nle), respectivamente, tuvieron un efecto positivo (es decir, aumentaron) el pEC₅₀ de hCRHR2. Sin embargo, también se encontró que estas sustituciones aumentaban el pEC₅₀ de hCRHR1 en mayor medida que el pEC₅₀ de hCRHR2, disminuyendo así la selectividad general.

Sin embargo, como se muestra en la Fig. 3, algunas sustituciones en las posiciones X^{20} , X^{21} , X^{26} , X^{30} y X^{41} Se encontró que disminuían el pEC_{50} de hCRHR1 mientras que el pEC_{50} de hCRHR2 permanecía sin cambios. Para la posición X^{20} , se encontró que la asparagina (N), la serina (S) y la treonina (T) disminuían el pEC_{50} de hCRHR1 sin comprometer el pEC_{50} de hCRHR2. Para la posición X^{21} , se encontró que la leucina (L); para la posición X^{26} , la leucina (L); para la posición X^{30} , la arginina (R), y para la posición X^{41} , la isoleucina (I), disminuían el pEC_{50} de hCRHR1 sin comprometer el pEC_{50} de hCRHR2. Por lo tanto, las posiciones X^{20} , X^{21} , X^{26} y/o X^{41} pueden usarse para recuperar una alta selectividad cuando se introducen sustituciones que mejoran la potencia, por ejemplo, Nle en la posición X^{38} (ver Ejemplo 5).

La Tabla 3 muestra pares moleculares coincidentes y la potencia mejorada obtenida al sustituir la leucina (L) presente en la posición X^{38} de la UCN2 por el aminoácido norleucina (Nle). Como se puede observar, la sustitución de L por Nle mejoró la potencia de hCRHR2, pero disminuyó la selectividad cuando las posiciones X^{20} y X^{41} correspondían al aminoácido natural presente en UCN2 (es decir, $X^{20}=E$ y $X^{41}=V$).

Tabla 3		Posiciones de aminoácidos																																Potencia										
SEQ ID NO:		X ⁴	X ⁵	X ⁶	X ⁷	X ⁸	X ⁹	X ¹⁰	X ¹¹	X ¹²	X ¹³	X ¹⁴	X ¹⁵	X ¹⁶	X ¹⁷	X ¹⁸	X ¹⁹	X ²⁰	X ²¹	X ²²	X ²³	X ²⁴	X ²⁵	X ²⁶	X ²⁷	X ²⁸	X ²⁹	X ¹⁰	X ³¹	X ³²	X ³³	X ³⁴	X ³⁵	X ³⁶	X ³⁷	X ³⁸	X ³⁹	X ⁴⁰	X ⁴¹	hCRHR2 pEC ₅₀	hCRHR1 pEC ₅₀			
21	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	S	A	R	E	E	R	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	I	9.1	4.2
22	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	S	A	R	E	E	R	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	I	9.8	5.3
23	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	I	9.3	4.4
24	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	I	9.4	6
25	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.1	5.2
26	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.5	6.6
27	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	I	9.5	4.2
28	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	I	9.8	5.9
29	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	I	9.6	4.4
30	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	I	9.9	5.8
31	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.1	5.4
32	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.5	7.6
33	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	8.9	3.9
34	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.6	4
35	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	I	9.3	4.1
36	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	I	9.8	5.3
37	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	8.5	3.8
38	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.4	4.2
39	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.3	6.1
40	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.4	7.6
41	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.2	4.8
42	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.7	6.6
43	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	I	9.3	4.2
44	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	I	10	5.9
3	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	A	E	A	A	R	E	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.3	4.6

5

10

15

20

25

30

35

Tabla 3		Posiciones de aminoácidos																				Potencia																							
SEQ ID NO:		X ⁴	X ⁵	X ⁶	X ⁷	X ⁸	X ⁹	X ¹⁰	X ¹¹	X ¹²	X ¹³	X ¹⁴	X ¹⁵	X ¹⁶	X ¹⁷	X ¹⁸	X ¹⁹	X ²⁰	X ²¹	X ²²	X ²³	X ²⁴	X ²⁵	X ²⁶	X ²⁷	X ²⁸	X ²⁹	X ¹⁰	X ³¹	X ³²	X ³³	X ³⁴	X ³⁵	X ³⁶	X ³⁷	X ³⁸	X ³⁹	X ⁴⁰	X ⁴¹	hCRHR1 pEC ₅₀	hCRHR2 pEC ₅₀				
45	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.6	6.7		
46	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	Q	R	Q	Q	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.5	5.6	
47	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	Q	R	Q	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.7	7.2	
48	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	E	R	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.4	4.7	
49	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	E	R	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.9	5.5	
50	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	L	R	E	E	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	8.7	3.8	
51	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	L	R	E	E	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.1	3.9	
52	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	Q	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.2	5.8
53	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	Q	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.5	6.6
54	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	Q	Q	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.4	4.7	
55	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	Q	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.9	6.6	
56	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	Q	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.4	5.5	
57	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	Q	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.9	7.2	
58	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	L	R	Q	Q	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.5	7	
59	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	L	R	Q	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.8	8.3	
60	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	S	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.3	4.6		
61	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	R	S	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	10	5.9		
62	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.5	4.6	
63	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.6	6.3	
64	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	Q	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.9	4.6	
65	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	Q	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	10	6.8	
66	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	E	R	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.5	4.3	
67	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	E	R	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.9	5.7	
68	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	L	A	E	V	9.6	4.2	
69	I	V	L	S	L	L	L	L	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	A	R	A	A	A	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	E	I	Nle	A	E	V	9.7	5.4	

SEQ ID NO:		Posiciones de aminoácidos																												Potencia													
		X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28	X29	X10	X31	X32	X33	X34	X35	X36	X37	X38	X39	X40	X41	hCRHR1 pEC ₅₀	hCRHR2 pEC ₅₀		
70	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	S	Q	R	E	E	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	8.9	3.8	
71	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	S	Q	R	E	E	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.2	4	
72	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	Q	L	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.5	6.6	
73	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	Q	L	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.7	8.4	
74	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	R	E	E	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	I	8.7	3.8	
75	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	E	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	I	9.1	3.8
76	I	V	L	S	L	L	D	V	c4NHPro	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	8.8	8.8	
77	I	V	L	S	L	L	D	V	c4NHPro	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.3	8.5	
78	I	V	L	S	L	L	D	Cle	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	Q	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.4	8.1	
79	I	V	L	S	L	L	D	Cle	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	Q	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.6	8.7	
80	I	V	L	S	L	L	D	V	c4FFPro	I	G	L	L	L	Q	I	L	T	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9	4.6
81	I	V	L	S	L	L	D	V	c4FFPro	I	G	L	L	L	Q	I	L	T	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.7	3.4
82	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.2	3.8
83	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.5	5.1
84	I	V	L	S	L	L	D	V	Hyp	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9	7.6	
85	I	V	L	S	L	L	D	V	Hyp	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.6	8.7	
86	I	V	L	S	L	L	D	Cle	c4FFPro	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.2	8.5
87	I	V	L	S	L	L	D	Cle	c4FFPro	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.5	8.6
88	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	I	9.2	4.4
89	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	I	9.4	3.4
90	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9	4.7	
91	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	R	E	Q	A	K*	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.4	8.8	
92	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	T	Q	A	R	A	R	Q	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.4	4	
93	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	T	Q	A	R	A	R	Q	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.4	3.8	
94	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	S	Q	A	R	A	R	I	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9	3.4	
95	I	V	L	S	L	L	D	V	P	I	G	L	L	L	Q	I	L	S	Q	A	R	A	R	I	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Ne	A	E	V	9.3	3.8	

Tabla 3

Tabla 3																																											
SEQ ID NO.	Posiciones de aminoácidos																				Potencia																						
	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉	X ₂₀	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆	X ₂₇	X ₂₈	X ₂₉	X ₁₀	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆	X ₃₇	X ₃₈	X ₃₉	X ₄₀	X ₄₁	hCRHR1 pEC ₅₀	hCRHR2 pEC ₅₀			
96	I	V	L	S	L	D	V	C4FFPro	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	N	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	8.7	3.7
97	I	V	L	S	L	D	V	C4FFPro	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	N	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.2	8.6
98	I	V	L	S	L	D	V	P	L	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.4	8
99	I	V	L	S	L	D	V	P	L	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.5	8.5
102	I	V	L	S	L	D	V	C4FFPro	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.1	3.6
103	I	V	L	S	L	D	V	C4FFPro	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.4	8.7
104	I	V	L	S	L	D	V	C4NHPr _o	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	I	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9	8.8
105	I	V	L	S	L	D	V	C4NHPr _o	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	I	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.1	8.3
106	I	V	L	S	L	D	V	C4FFPro	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9	3.8
107	I	V	L	S	L	D	V	C4FFPro	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.2	3.6
108	I	V	L	S	L	D	Cle	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.3	8.5
109	I	V	L	S	L	D	Cle	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	V	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.4	8.6
110	I	V	L	S	L	D	Cle	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.2	8.7
111	I	V	L	S	L	D	Cle	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.5	8.8
112	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	N	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.2	3.5
113	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	N	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.7	3.4
114	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	N	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.2	4.3
115	I	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	N	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.7	8.7
116	I	V	L	S	L	D	V	C4NHPr _o	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	Q	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	L	A	E	V	9.1	9.1
117	I	V	L	S	L	D	V	C4NHPr _o	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	E	Q	A	R	A	R	Q	A	A	R	E	Q	A	K	T	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	9.3	8.9
118	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	A	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	A	E	I	L	A	E	V	10.7	4
119	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	A	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	10.7	6
120	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	D	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	A	E	I	L	A	E	V	10.1	5.2
121	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	D	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	A	E	I	Nle	A	E	V	10.2	4.7
122	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	G	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	A	E	I	L	A	E	V	11	4

Tabla 3

SEQ ID NO:	Tabla 3 Posiciones de aminoácidos																				Potencia																				
	X ⁴	X ⁵	X ⁶	X ⁷	X ⁸	X ⁹	X ¹⁰	X ¹¹	X ¹²	X ¹³	X ¹⁴	X ¹⁵	X ¹⁶	X ¹⁷	X ¹⁸	X ¹⁹	X ²⁰	X ²¹	X ²²	X ²³	X ²⁴	X ²⁵	X ²⁶	X ²⁷	X ²⁸	X ²⁹	X ¹⁰	X ³¹	X ³²	X ³³	X ³⁴	X ³⁵	X ³⁶	X ³⁷	X ³⁸	X ³⁹	X ⁴⁰	X ⁴¹	hCRHR1 pEC ₅₀	hCRHR2 pEC ₅₀	
123	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	G	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	6.1	11.3
20	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	5.9	10
124	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	6.6	11.2
125	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	H	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	2.6	9.6
126	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	H	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	6.1	11
127	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	F	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	9.7	2.1
128	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	F	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	11.3	4
129	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	P	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	9.8	4.1
130	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	P	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	10.2	4.7
131	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	10.6	3.1
132	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	10.7	6.1
133	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	T	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	10.8	2.6
134	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	T	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	11.1	6.1
135	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	W	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	10.3	2.2
136	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	W	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	10.4	3.2
137	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	V	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	10.5	2.9
138	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	V	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	10.8	6
139	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	10.6	5.7
140	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	11.9	6.4
141	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	9.9	2.7
142	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	10.4	5.6
143	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	L	A	E	V	N	A	E	E	I	L	A	E	V	9.7	2.2
144	Met	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	A	E	I	Nle	A	E	V	N	A	E	E	I	Nle	A	E	V	10.4	5.6

Tabla 3		Posiciones de aminoácidos																												Potencia											
SEQ ID NO:		X ⁴	X ⁵	X ⁶	X ⁷	X ⁸	X ⁹	X ¹⁰	X ¹¹	X ¹²	X ¹³	X ¹⁴	X ¹⁵	X ¹⁶	X ¹⁷	X ¹⁸	X ¹⁹	X ²⁰	X ²¹	X ²²	X ²³	X ²⁴	X ²⁵	X ²⁶	X ²⁷	X ²⁸	X ²⁹	X ¹⁰	X ³¹	X ³²	X ³³	X ³⁴	X ³⁵	X ³⁶	X ³⁷	X ³⁸	X ³⁹	X ⁴⁰	X ⁴¹	hCRHR2 pEC ₅₀	hCRHR1 pEC ₅₀
145	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	A	N	A	E	V	10.6	2.9	
146	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	A	N	A	E	V	10.9	6	
147	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	Q	N	A	E	V	10.7	3.2	
148	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	Q	N	A	E	V	11	5.9	
149	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	G	N	A	E	V	10	2.2	
150	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	G	N	A	E	V	10.1	2	
151	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	H	N	A	E	V	10.7	2.8	
152	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	H	N	A	E	V	10.9	6	
153	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	I	N	A	E	V	10.6	5.8	
154	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	I	N	A	E	V	10.9	6.1	
155	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	L	N	A	E	V	10.3	3.3	
156	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	L	N	A	E	V	10.6	6.2	
157	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	F	N	A	E	V	9.8	2.7	
158	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	F	N	A	E	V	10.7	5.3	
159	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	P	N	A	E	V	8.2	2	
160	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	P	N	A	E	V	9.1	2.6	
161	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	S	N	A	E	V	10.4	2.3	
162	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	S	N	A	E	V	11.7	4.6	
163	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	T	N	A	E	V	10.5	3.8	
164	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	T	N	A	E	V	10.9	6	
165	MeI	V	L	S	L	D	V	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	S	Q	A	R	A	R	A	A	A	R	E	I	Q	A	K*	W	N	A	E	V	10	2.4	

Tabla 3		Posiciones de aminoácidos																		Potencia	
SEQ ID NO:																				hCRHR1 pEC ₅₀	hCRHR2 pEC ₅₀
166	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	5.9
167	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	2.5
168	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	5.4
169	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	3.7
170	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	6.3
171	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	6.1
172	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	6.3
173	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	1.9
174	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	3.1
175	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	2.1
176	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	2.2
177	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	2.5
178	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	5.9
179	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	2
180	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	2.5
181	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	2.3
182	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	4.2
183	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	2.1
184	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	3
185	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	5.2
186	MeI	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	V	6.2

5

10

15

20

25

30

35

Tabla 3		Posiciones de aminoácidos																				Potencia																			
SEQ ID NO:		X41	X40	X39	X38	X37	X36	X35	X34	X33	X32	X31	X10	X29	X28	X27	X26	X25	X24	X23	X22	X21	X20	X19	X18	X17	X16	X15	X14	X13	X12	X11	X10	X9	X8	X7	X6	X5	X4	hCRHR1 pEC ₅₀	hCRHR2 pEC ₅₀
187	Met	V	E	A	L	I	E	F	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	S	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	1.9	9.2
188	Met	V	E	A	Nle	I	E	F	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	S	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	4.4	10.6
189	Met	V	E	A	L	I	E	S	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	S	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	1.6	10.5
190	Met	V	E	A	Nle	I	E	S	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	S	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	4.5	11.1
191	Met	V	E	A	L	I	E	T	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	S	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	2.2	10.5
192	Met	V	E	A	Nle	I	E	T	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	S	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	2.6	12.1
193	Met	V	E	A	L	I	E	W	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	S	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	2.4	10.1
194	Met	V	E	A	Nle	I	E	W	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	S	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	3.3	10.5
195	Met	V	E	A	L	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	2.4	10
196	Met	V	E	A	Nle	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	6	10.5
197	Met	V	E	A	L	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	2.3	9.9
198	Met	V	E	A	Nle	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	4.2	10.5
199	Met	V	E	A	L	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	2.6	9.7
200	Met	V	E	A	Nle	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	5.9	10
201	Met	V	E	A	L	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	2.7	10.2
202	Met	V	E	A	Nle	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	6.1	10.6
203	Met	V	E	A	L	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	2.5	9.5
204	Met	V	E	A	Nle	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	6	10.6
16	Met	V	E	A	L	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	5.9	10.2
205	Met	V	E	A	Nle	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	5.9	10.2
206	Met	V	E	A	L	I	E	Alb	N	T	K*	A	Q	E	R	A	A	R	A	A	A	Q	A	L	L	I	Q	L	L	G	I	P	V	D	L	S	L	V	Met	4	10.3

Aminoácidos ejemplificados en la tabla 3		Tabla 3 Posiciones de aminoácidos																												Potencia																
		X ⁴	X ⁵	X ⁶	X ⁷	X ⁸	X ⁹	X ¹⁰	X ¹¹	X ¹²	X ¹³	X ¹⁴	X ¹⁵	X ¹⁶	X ¹⁷	X ¹⁸	X ¹⁹	X ²⁰	X ²¹	X ²²	X ²³	X ²⁴	X ²⁵	X ²⁶	X ²⁷	X ²⁸	X ²⁹	X ³⁰	X ³¹	X ³²	X ³³	X ³⁴	X ³⁵	X ³⁶	X ³⁷	X ³⁸	X ³⁹	X ⁴⁰	X ⁴¹	hCRHR2 pEC ₅₀	hCRHR1 pEC ₅₀					
SEQ ID NO:		Met	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	His	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.4	6
207		Met	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	His	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.4	6	
208		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	9.7	2.3	
209		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.7	5.5	
210		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Fen	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	9.7	2		
211		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Fen	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.6	4.1		
212		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Pro	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	9.3	2.2		
213		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Pro	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	9.7	4.3		
214		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Ser	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.1	2.7		
215		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Ser	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.6	5.5		
216		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	9.8	3.3		
217		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.4	6		
218		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10	2.3		
219		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.1	2.6		
220		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	9.6	2.6		
221		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.6	3.6		
222		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.2	3.8		
223		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10.3	6.3		
224		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	9.1	2		
225		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	10	4.6		
226		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	9.4	2.2		
227		Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	9.7	5.5		
		I, Met	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	His	Gln	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	-	-	

5

10

15

20

25

30

35

Ejemplo 5: Mejora de la potencia de hCRHR2 manteniendo una alta selectividad, estabilidad química y solubilidad.

Para identificar sustituciones adicionales en la posición X^{20} capaces de restaurar la alta selectividad para hCRHR2, se sintetizó una biblioteca de 74 péptidos. Se introdujeron 18 sustituciones de aminoácidos en la posición X^{20} en los análogos químicamente estables de la UCN2, que se lipidaron en la posición X^{32} , se sustituyeron con un ácido glutámico (E) en las posiciones X^{36} y X^{40} , y se sustituyeron con Aib en X^{33} o X^{35} (es decir, referencia 1 o 2 en la Tabla 4).

Los valores de EC_{50} en hCRHR2 y hCRHR1 se determinaron para cada biblioteca y los valores SHAP se calcularon a partir de un modelo de bosque aleatorio, donde los valores de pEC_{50} se ajustaron a las secuencias de aminoácidos del péptido. Los valores delta medios SHAP se utilizaron para determinar el nivel de contribución de cada sustitución de aminoácido en relación con el residuo UCN2 nativo correspondiente en la potencia de hCRHR2 y hCRHR1 (Breiman, L. (2001), *Random Forests, Machine Learning* 45(1), 5-32.; Lundberg, SM, & Lee, SI (2017). *A unified approach to interpreting model predictions. Advances in neural information processing systems*, 30.). Las sustituciones con valores delta medios SHAP positivos aumentaron el punto final en relación con el residuo UCN2 nativo, mientras que los valores delta medios SHAP negativos disminuyeron el punto final en relación con el residuo UCN2 nativo. La contribución de cada aminoácido se resume en la Fig. 4.

Los resultados de la Fig. 4 demuestran los efectos de mejora de la potencia de $X^{38}=Nle$ y el efecto de mejora de la selectividad de la sustitución de la posición X^{20} cuando $X^{38}=Nle$. En X^{20} , los siguientes aminoácidos tuvieron un efecto negativo sobre hCRHR1 mientras que no afectaron significativamente de forma negativa a hCRHR2 pEC_{50} : A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V. Por lo tanto, cuando $X^{38}=Nle$, la relación de selectividad para el hCRHR2 sobre el hCRHR1 (es decir, $hCRHR1\ EC_{50}/hCRHR2\ EC_{50}$), puede mejorarse sustituyendo el glutamato (E) presente en X^{20} con A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V. En una modalidad preferida, cuando $X^{38}=Nle$, para mejorar la potencia, X^{20} se selecciona como A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V para restaurar una alta selectividad para hCRHR2. En una modalidad más preferida, cuando $X^{38}=Nle$, para mejorar la potencia, X^{20} se selecciona como N, F, G, K, Q, S o T para restaurar una alta selectividad para hCRHR2. En la modalidad más preferida, cuando $X^{38}=Nle$, para mejorar la potencia, X^{20} se selecciona como S.

Tabla 4. Mejora de la selectividad en péptidos que tienen X ³⁸ = Nle																																											
	Posiciones de aminoácidos																																						Potencia		Selectividad		
SEQ ID NO.	X ⁴	X ⁵	X ⁶	X ⁷	X ⁸	X ⁹	X ¹⁰	X ¹¹	X ¹²	X ¹³	X ¹⁴	X ¹⁵	X ¹⁶	X ¹⁷	X ¹⁸	X ¹⁹	X ²⁰	X ²¹	X ²²	X ²³	X ²⁴	X ²⁵	X ²⁶	X ²⁷	X ²⁸	X ²⁹	X ³⁰	X ³¹	X ³²	X ³³	X ³⁴	X ³⁵	X ³⁶	X ³⁷	X ³⁸	X ³⁹	X ⁴⁰	X ⁴¹	hCRHR1	hCRHR2			
																																							pEC ₅₀	pEC ₅₀			
205 (Ref. 1)	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.2	5.9	20689	hCRHR1 EC50/hCR HR2 EC50
196	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	A	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.5	6	> Ref. 1	
198	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	R	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.5	4.2	> Ref. 1	
202	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	Q	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.6	6.1	> Ref. 1	
204	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	G	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.6	6	> Ref. 1	
207	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	H	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.4	6	> Ref. 1	
209	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	I	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.7	5.5	> Ref. 1	
229	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.1	5.2	> Ref. 1	
230	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	K	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.3	4.5	> Ref. 1	
211	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	F	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.6	4.1	> Ref. 1	
215	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.6	5.5	> Ref. 1	
217	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	T	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.4	6	> Ref. 1	
231	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	V	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	V	10.2	5.6	> Ref. 1	
140	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	T	N	Aib	E	I	Nle	A	E	11.9	6.4	> Ref. 1	
124 (Ref. 2)	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	E	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	11.2	6.6	40378	
119	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	A	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	10.7	6	>Ref. 2	
232	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	R	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	9.8	4.3	>Ref. 2	
123	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	G	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	11.3	6.1	>Ref. 2	
126	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	H	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	11	6.1	>Ref. 2	
235	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	L	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	9.9	3.8	>Ref. 2	
233	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	K	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	10.4	5.5	>Ref. 2	
128	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	F	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	11.3	4	>Ref. 2	
132	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	S	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	10.7	6.1	>Ref. 2	
134	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	T	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	11.1	6.1	>Ref. 2	
138	Mel	V	L	S	L	D	V	P	I	G	L	L	Q	I	L	L	V	Q	A	R	A	R	A	R	A	A	R	E	Q	A	K*	Aib	N	A	E	I	Nle	A	E	10.8	6	>Ref. 2	

5

10

15

20

25

30

35

Los resultados de la Tabla 5 confirman los efectos de mejora de la potencia de X³⁸=Nle y el efecto de mejora de la selectividad de la sustitución en la posición X²⁰ cuando X³⁸=Nle. Asimismo, se muestra el efecto de mantenimiento de la selectividad de la sustitución en la posición X⁴¹. Los datos demuestran además que la alta estabilidad química (obtenida en las posiciones X³³ o X³⁵), la alta estabilidad física (sin fibrilación) y la alta solubilidad (obtenida en las posiciones X³⁶ y X⁴⁰) se conservan al introducir estas sustituciones.

Tabla 5							
SEQ. ID NO.	Sustituciones relativas al comparador	hCRHR2 EC ₅₀ (nM)	hCRHR1 EC ₅₀ (nM)	Relación de selectividad (hCRHR1/hCRHR2)	Estabilidad química a pH 7.5 después de 14 días / 28 días a 40°C (% de degradación)	Fibrilación (pH 7.5)	Solubilidad pH 7.5, concentració n objetivo =10 mg/mL (medido en mg/mL)
3 (Comparador)	-	1.1	>5000	>4546	-6.1 / -15	No	10
45	X ³⁸ =Nle	0.52	56	107	ND	ND	ND
83	X ²⁰ =S; X ³⁸ =Nle	0.55	>5000	>9091	-3.2 / -10	No	9.5
69	X ³⁸ =Nle; X ⁴¹ =I(NH ₂)	0.54	>5000	>9259	-0.5 / -8.8	No	10
89	X ²⁰ =S; X ³⁸ =Nle; X ⁴¹ =I(NH ₂)	0.55	>5000	>9091	ND	ND	ND
234	X ²⁰ =S; X ³⁵ =Aib; X ³⁸ =Nle	0.8	>5000	>6250	-0.43 / -1.1	No	11
100	X ³⁵ =Aib; X ³⁸ =Nle; X ⁴¹ =I	0.77	>5000	>6494	-0.43 / -0.8	No	11
236	X ³³ =Aib; X ³⁸ =Nle; X ⁴¹ =I	0.67	>5000	>7463	-1 / -3	No	10
237	X ²⁰ =S; X ³³ =Aib; X ³⁸ =Nle	0.77	>5000	>6494	-1.1 / -2.8	No	10
239	X ²⁰ =S; X ³³ =E; X ³⁸ =Nle	0.9	>5000	>5556	-1.9 / -2.2	No	11
132	X ⁴ =Mel; X ²⁰ =S; X ³³ =Aib; X ³⁸ =Nle	0.77	>5000	>6494	-1.6 / -1.3	No	11
238	X ⁴ =P; X ²⁰ =S; X ³³ =Aib; X ³⁸ =Nle	0.79	>5000	>6329	-1.6 / -4.6	No	11

Tabla 5							
SEQ. ID NO.:	Sustituciones relativas al comparador	hCRHR 2 EC ₅₀ (nM)	hCRHR1 EC ₅₀ (nM)	Relación de selectividad (hCRHR1/hCRHR2)	Estabilidad química a pH 7.5 después de 14 días / 28 días a 40°C (% de degradación)	Fibrilación (pH 7.5)	Solubilidad pH 7.5, concentración objetivo =10 mg/mL (medido en mg/mL)
215	X ⁴ =Mel; X ²⁰ =S; X ³⁵ =Aib; X ³⁸ =Nle	0.87	>5000	>5747	-0.92 / 0.31	No	12
101	X ⁴ =Mel; X ²⁰ =S; X ³³ =E; X ³⁸ =Nle	0.92	>5000	5435	-2.2 / -4.3	No	11

Ejemplo 6 – Caracterización biofísica ampliada de compuestos seleccionados

Solubilidad de péptidos seleccionados a diferentes pH

Se evaluó la solubilidad de compuestos seleccionados con estabilidad química mejorada hasta 20 mg/mL a diferentes valores de pH, con y sin conservante. En este caso, se utilizó fenol como conservante. Los compuestos se disolvieron a una concentración nominal de 4000 µM y se analizaron según lo descrito anteriormente. Las muestras con fenol contenían 5.0 mg/ml de fenol. La concentración medida de péptidos en solución se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Solubilidad de péptidos seleccionados				
SEQ. ID NO.:	pH 6.5 (mg/ml)	pH 7.0 (mg/mL)	pH 7.5 (mg/mL)	pH 7.5 + fenol (mg/mL)
6	21.1	20.0	18.7	18.1
238	20.4	20.6	18.0	17.9
16	20.6	19.8	17.9	18.0
215	19.6	20.6	17.7	18.0

En conclusión, todos los péptidos fueron solubles hasta 20 mg/mL en el rango de pH de 6.5 a 7.5. A pH 7.5, todos los péptidos fueron solubles hasta al menos 20 mg/mL en presencia de 5.0 mg/mL de fenol.

Estabilidad química de péptidos seleccionados

Se evaluó la estabilidad química de péptidos seleccionados a diferentes valores de pH a 40°C durante 28 días. Las muestras se prepararon y analizaron según el procedimiento descrito, con la adición de muestras de ajuste de pH a los valores objetivo indicados a continuación. Como comparador, se incluyó en el conjunto de muestras el fármaco comercial semaglutida (Ozempic®, Novo Nordisk). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Estabilidad química de péptidos seleccionados

SEQ. ID NO:	pH	Pérdida de pureza (análisis RP-UPLC)		Formación de HMWP (análisis SEC)	
		T14-T0 (%)	T28-T0 (%)	T14-T0 (%)	T28-T0 (%)
6	7.0	-1.8	-2.0	-0.1	0.1
6	7.5	-1.1	-2.6	-0.4	-0.4
6	8.0	-3.1	-7.1	-0.2	0.0
238	7.0	-1.0	-1.2	0.3	0.5
238	7.5	-3.1	-4.8	0.4	0.4
238	8.0	-5.1	-9.8	-0.1	0.2
16	7.0	-0.6	-1.1	-0.3	-0.3
16	7.5	-0.1	-0.3	0.0	0.0
16	8.0	-0.5	-1.1	-0.2	-0.3
215	7.0	0.2	-0.3	-0.3	-0.3
215	7.5	0.1	-0.1	0.1	0.3
215	8.0	-0.4	-0.7	0.0	-0.1
semaglutida	7.4	-2.2	-2.8	0.7	0.9

Todos los péptidos mostraron una degradación química inferior al 10% tras 28 días a 40°C. No se observó la formación de HMWP en ninguno de los péptidos.

Mediciones de tamaño de partículas mediante dispersión dinámica de luz (DLS).

Las muestras se prepararon y midieron según el procedimiento descrito. Los radios hidrodinámicos (Rh) y la polidispersidad (PD) asociada, obtenidos mediante análisis de cumulantes (suponiendo una sola especie), se muestran en la Tabla 8 como promedios de tres réplicas. T0 indica la medición en el tiempo cero después de la preparación de la muestra; T5 indica las mediciones de cinco días de incubación, tal como se describió anteriormente.

Tabla 8			
SEQ. ID NO.	Punto temporal	Rh (nm)	PD (%)
6	T0	5.8	38.5
6	T5	30.6	Multimodal
238	T0	4.8	5.3
238	T5	4.8	8.1
16	T0	4.7	10.5
16	T5	4.7	11.6
215	T0	5.6	10.8
215	T5	5.9	15.1
Liraglutida pH 8.2	T0	2.1	1.4
Liraglutida pH 8.2	T5	2.1	3.8
Liraglutida pH 6.7	T0	2.5	6.0
Liraglutida pH 6.7	T5	5.6	Multimodal

En conclusión, la SEQ ID NO: 6 y la liraglutida pH 6.7 formaron partículas más grandes y varias especies (multimodales) durante los cinco días de incubación a 40°C con agitación continua, mientras que todos los demás compuestos no mostraron aumentos o solo aumentos menores en los radios hidrodinámicos, lo que indica una alta estabilidad física/coloidal durante la incubación.

Formación de fibrillas amiloides evaluada mediante un ensayo de ThT.

Los compuestos se disolvieron a 200 μ M (aprox. 1.0 mg/ml) en amortiguador de fosfato de 50 mM, y la preparación y el ensayo de ThT se realizaron como se describe en el "Procedimiento general para la

determinación de la formación de fibrillas de péptidos" anterior. Además, las muestras se ajustaron a los valores de pH que se indican a continuación. Se prepararon coformulaciones adicionales de los compuestos con semaglutida disolviendo los compuestos a 200 μ M en el producto farmacéutico de semaglutida disponible comercialmente (Ozempic®); estas coformulaciones se ajustaron a pH 7.4. La formación de fibrillas amiloides detectada por un aumento en la fluorescencia de ThT se indicó con "Sí", mientras que las muestras sin aumento de la fluorescencia de ThT, y por lo tanto sin formación de fibrillas amiloides, se indicaron con "No". Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9				
SEQ. ID NO.	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0	+ semaglutida (Ozempic®), pH 7.4
6	No	No	No	No
238	No	No	No	No
16	No	No	No	No
215	No	No	No	No
Ninguno	NA	NA	NA	No

En conclusión, ninguno de los compuestos analizados formó fibrillas amiloides en el rango de pH de 7.0 a 8.0 en fosfato 50 mM. Todos los compuestos pudieron coformularse con semaglutida sin observarse precipitación inmediata ni formación de fibrillas amiloides.

Ejemplo 7 – Caracterización de la potencia de compuestos seleccionados

Diferentes especies

Se evaluó la potencia de péptidos seleccionados en diferentes especies (ratón, rata, cerdo) utilizando células CHO-K1 transfectadas transitoriamente, siguiendo el procedimiento general.

La Tabla 10 muestra los valores de EC₅₀ (promedio, n=3) de péptidos seleccionados probados contra los receptores CRH 1 y 2 humanos, de ratón, de rata y porcinos utilizando sistemas de células CHO-K1 transfectadas transitoriamente (pcDNA3.1(+)-N o C-DYK de Genscript, rCRHR2 NM_022714.1 (rata), rCRHR1 NM_030999.4 (rata), mCRHR2 NM_001288618.1 (ratón), mCRHR1 NM_007762.5 (ratón), pCRHR1 (cerdo), pCRHR2 (cerdo), hCRHR1 NM_004382.5 (humano), hCRHR2a NM_001883.5 (humano), hCRHR2b NM_001202475.1 (humano)).

Tabla 10

ID SEQ NO.	Sustituciones relativas a SEQ ID NO: 3	EC ₅₀ estable (nM)	Sistema celular transitorio EC50 (nM)				EC ₅₀ estable (nM)	Sistema celular transitorio EC50 (nM)				
		hCRHR 1	hCR HR1	mCRH R1	rCR HR1	pCR HR1	hCRHR 2a	hCR HR2 a	hCRH R2b	mCRH R2	rCRH R2	pCRH R2
3	-	>5000	>1000	44	163	>5000	1.1	0.016	0.0081	0.0054	0.070	0.027
6	X ⁴ =Mel; X ³² =T; X ³³ =K(Lip)	>5000	>1000	71	275	>5000	3.0	0.023	0.015	0.0043	0.13	0.030
238	X ⁴ =P; X ²⁰ =S; X ³³ =Aib; X ³⁸ =Nle	>5000	>5000	323	>1000	>5000	0.79	0.018	0.016	0.0047	0.067	0.015
16	X ⁴ =Mel; X ³⁵ =Aib	>5000	>1000	76	256	>5000	2.7	0.025	0.012	0.0049	0.19	0.028
215	X ⁴ =Mel; X ²⁰ =S; X ³⁵ =Aib; X ³⁸ =Nle	>5000	826	50	175	>1000	0.87	0.013	0.016	0.0040	0.072	0.017

Se obtuvieron diferencias inferiores a 10 veces en los valores de EC₅₀ entre la especie humana y las especies analizadas para los sistemas de células transfectadas transitoriamente. Se observó un alto nivel de correlación ($R^2=0.81$) para las dos isoformas del receptor CRHR2 humano (hCRHR2a frente a hCRHR2b).

Ejemplo 8 – Caracterización farmacocinética de péptidos seleccionados

Se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de péptidos seleccionados en ratones, ratas y cerdos siguiendo los procedimientos generales descritos anteriormente. Los resultados de estos estudios se presentan en las Tablas 11, 12, 13 y 14 a continuación.

Tabla 11

	Rata		Ratón		Cerdo	
SEQ. ID NO.	T _{1/2}	MRT	T _{1/2}	MRT	T _{1/2}	MRT
3	7.7	9.2	13.5	17.5	156	235
5	8.6	7.9	14.3	21	162	218
4	5.3	6.4	14.8	18.2	NA	NA
6	6.1	7.4	14.7	16	145	195
14	5.1	6.1	NA	NA	NA	NA
15	7.7	8	NA	NA	NA	NA

Tabla 11						
	Rata		Ratón		Cerdo	
SEQ. ID NO.	T½	MRT	T½	MRT	T½	MRT
19	5.9	7.4	NA	NA	NA	NA
17	7.1	7.6	NA	NA	NA	NA
234	4.1	5.1	NA	NA	NA	NA
237	4.1	5.1	NA	NA	NA	NA
132	4.8	6.2	11.2	16	122	162
238	10.2	14.2	19.6	21.4	212	293
16	7.8	9.4	15.9	21.5	208	278
215	5.7	6.7	12.6	17.4	156	211
101	6.5	6.8	NA	NA	NA	NA

Tabla 12							
SEQ. ID NO.	Especies	Tratamiento	T½ (h)	Cl (L/h/kg)	F (%)	Cmax (nmol/L)	tmax (h)
3	Ratón	50 nmol/kg iv	13.5	<0.01	-	-	-
		50 nmol/kg sc	11.4	-	43.1	141	24
6	Ratón	15 nmol/kg iv	14.7	0.0033	-	-	-
		15 nmol/kg sc	16	-	78	90	24
238	Ratón	15 nmol/kg iv	19.6	0.0044	-	-	-
		15 nmol/kg sc	25.2	-	60	48	24
16	Ratón	15 nmol/kg iv	15.9	0.0037	-	-	-
		15 nmol/kg sc	14.8	-	62	60	6
215	Ratón	15 nmol/kg iv	12.6	0.004	-	-	-
		15 nmol/kg sc	14.1	-	56	58	6

Tabla 13							
SEQ. ID NO.	Especie	Tratamiento	T½ (h)	Cl (L/h/kg)	F (%)	Cmax (nmol/L)	tmax (h)
3	Rata	50 nmol/kg iv	7.7	0.005	-	-	-
		50 nmol/kg sc	7.9	-	27	90	24
6	Rata	50 nmol/kg iv	6.1	0.009	-	-	-
		50 nmol/kg sc	8.4	-	35	70	24
238	Rata	50 nmol/kg iv	10.2	0.007	-	-	-
		50 nmol/kg sc	11	-	43	91	24
16	Rata	50 nmol/kg iv	7.8	0.007	-	-	-
		50 nmol/kg sc	9.8	-	31	87	24
215	Rata	50 nmol/kg iv	5.7	0.012	-	-	-
		50 nmol/kg sc	6.1	-	28	42	24

Tabla 14							
SEQ. ID NO.	Especie	Tratamiento	T½ (h)	Cl (L/h/kg)	F (%)	Cmax(nmol/L)	tmax (h)
5	3	6.0 nmol/kg iv	156	0.00030	-	-	-
		6.0 nmol/kg sc	-	-	55	60	24
	6	6.0 nmol/kg iv	145	0.00034	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
10	238	5.8 nmol/kg iv	212	0.00028	-	-	-
		6.0 nmol/kg sc	-	-	86	44	48
	16	4.6 nmol/kg iv	208	0.00028	-	-	-
		6.0 nmol/kg sc	-	-	66	35	48
	215	4.2 nmol/kg iv	156	0.0003	-	-	-
		6.0 nmol/kg sc	-	-	68	38	24

En conclusión, todos los péptidos evaluados mostraron perfiles farmacocinéticos favorables compatibles con la administración semanal en humanos.

Ejemplo 9 – Efecto de péptidos seleccionados sobre la ingesta aguda de alimentos en ratones

Se seleccionaron compuestos y se sometieron a pruebas siguiendo el procedimiento general para evaluar la ingesta aguda de alimentos en ratones, con el fin de determinar el efecto de una dosis subcutánea única sobre la ingesta de alimentos durante 3 días. Los resultados se muestran en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15 - Ingesta aguda de alimentos en relación con el vehículo 24 horas después de la administración de la dosis.			
SEQ. ID NO.	% FI en comparación con el vehículo, 24 h después de la administración		
	30 nmol/kg	100 nmol/kg	300 nmol/kg
3	67.63***	30.75***	30.66***
5	45.67***	18.68***	15.93***
4	63.41***	19.33***	18.14***
6	51.61***	25.76***	12.69***
19	56.47***	29.68***	21.66***
17	78.97*	48.64***	19.52***
237	51.49***	16.66***	13.2***
132	46.64***	18.5***	20.04***
238	29.73***	12.92***	7.94***
16	44.62***	18.21***	12.36***
215	38.67***	20.26***	10.31***
101	30.85***	21.44***	8.09***

Prueba de Dunnett para el modelo lineal de un factor, en comparación con el vehículo: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

En conclusión, todos los péptidos seleccionados demostraron una reducción de la ingesta de alimentos dependiente de la dosis en comparación con los animales tratados con el vehículo.

5 Ejemplo 10: Evaluación del efecto sobre el peso corporal y la composición corporal en ratones con obesidad inducida por la dieta.

Se evaluó el efecto de péptidos seleccionados sobre la composición corporal en ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO). Los resultados de los dos estudios con modelos de ratones DIO se presentan en las Tablas 16 y 17 y en la Fig. 5.

10 El tratamiento con la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 215 durante 28 días produjo una reducción prolongada y dependiente de la dosis en el peso corporal relativo en comparación con los animales tratados con el vehículo. En los grupos tratados con 30 nmol/kg, el peso corporal se redujo aproximadamente un 20% del peso corporal inicial.

Tabla 16					
	Vehículo	SEQ ID NO. 3			
Dosis [nmol/kg]	NA	10	30	60	100
Peso corporal al finalizar el tratamiento [g $\pm$ SEM]	47.7 $\pm$ 1.6	41.9 $\pm$ 1.5**	38.2 $\pm$ 1.0***	38.5 $\pm$ 0.6***	37.3 $\pm$ 0.6***
Cambio relativo del peso corporal al finalizar el estudio [% $\pm$ SEM]	100.6 $\pm$ 1.0	94.3 $\pm$ 1.6*	89.0 $\pm$ 2.2***	89.9 $\pm$ 1.9***	87.7 $\pm$ 1.3***
Cambio en la masa grasa con respecto al valor inicial [g $\pm$ SEM]	-0.9 $\pm$ 0.6	-7.7 $\pm$ 0.7***	-10.2 $\pm$ 0.6***	-10.8 $\pm$ 0.6***	-11.2 $\pm$ 0.6***
Cambio de masa magra con respecto al valor inicial [g $\pm$ SEM]	-0.8 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3***	0.4 $\pm$ 0.4*	0.8 $\pm$ 0.3***	0.8 $\pm$ 0.2***
<i>M. Soleus</i> [g]	0.009 $\pm$ 0.0004	0.011 $\pm$ 0.0005	0.012 $\pm$ 0.0005**	0.012 $\pm$ 0.0004**	0.011 $\pm$ 0.0006*
<i>M. Gastrocnemius</i> [g]	0.15 $\pm$ 0.003	0.17 $\pm$ 0.005***	0.17 $\pm$ 0.003**	0.16 $\pm$ 0.004*	0.17 $\pm$ 0.003***
HbA1c en sangre [%]	4.5 $\pm$ 0.04	4.3 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1***	4.15 $\pm$ 0.1**	4.1 $\pm$ 0.1**
Prueba de Dunnett para el modelo lineal de un factor comparado con el vehículo DIO: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$					

Tabla 17										
		SEQ ID NO:								
	Vehículo	3	6		238		16		215	
Dosis [nmol/kg]	NA	30	10	30	10	30	10	30	10	30
Peso corporal al finalizar [g ± SEM]	46.3 ± 1.1	39.3 ± 0.9***	42.6 ± 1.3	38 ± 0.5***	39.1 ± 0.7***	37.4 ± 0.9***	44 ± 1.1	38.3 ± 0.9***	40.5 ± 1.2***	38.9 ± 1.1***
Cambio relativo del peso corporal al finalizar el estudio [% ± SEM]	96.8 ± 1.5	82.4 ± 1.6***	89.1 ± 2.0**	79.3 ± 1.2***	82.3 ± 1.2***	77.9 ± 0.7***	91.1 ± 1.2*	79.9 ± 1.4***	85.5 ± 1.3***	81.8 ± 1.9***
Cambio en la masa grasa con respecto al valor inicial [g ± SEM]	-1.5 ± 0.6	-9.5 ± 0.6***	-7.0 ± 0.9***	-10.7 ± 0.5***	-9.5 ± 0.6***	-10.7 ± 0.3***	-5.6 ± 0.5***	-10.5 ± 0.6***	-8.7 ± 0.5***	-9.9 ± 0.7***
Cambio de masa Magra con respecto al valor inicial [g ± SEM]	-0.9 ± 0.6	-0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.3	-0.1 ± 0.3	-0.4 ± 0.2	-0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.3*	-0.6 ± 0.3	0.1 ± 0.5	-0.5 ± 0.3
<i>M. Soleus</i> [g]	0.011 ± 0.0009	0.013 ± 0.0006	0.012 ± 0.0008	0.013 ± 0.0004	0.012 ± 0.0003	0.011 ± 0.0007	0.013 ± 0.0004	0.013 ± 0.0009	0.012 ± 0.0005	0.012 ± 0.0005
<i>M. Gastrocnemius</i> [g]	0.18 ± 0.003	0.19 ± 0.003**	0.18 ± 0.004	0.18 ± 0.001	0.18 ± 0.001	0.18 ± 0.004	0.19 ± 0.003*	0.19 ± 0.002*	0.19 ± 0.002***	0.18 ± 0.003
HbA1c en sangre [%]	4.7 ± 0.03	4.2 ± 0.1***	4.0 ± 0.1***	4.1 ± 0.1***	4.3 ± 0.04**	4.4 ± 0.1**	4.4 ± 0.1	4.1 ± 0.1***	4.3 ± 0.1***	4.4 ± 0.03*
Prueba de Dunnett para el modelo lineal de un factor comparado con el vehículo DIO: *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001										

Los datos demostraron una buena correlación entre las potencias *in vitro* y los efectos *in vivo*. La Fig. 5 muestra la SEQ ID NO: 215 comparada con la SEQ ID NO: 16, donde la SEQ ID NO: 215 produce una pérdida de peso corporal relativamente mayor cuando se administra a una dosis de 10 nmol/kg. La reducción significativa del peso corporal después de 4 semanas de tratamiento se correlacionó con la pérdida de masa de tejido graso, mientras que la masa de tejido magro absoluta se mantuvo. En consonancia con los resultados de la resonancia magnética, el tratamiento con los péptidos seleccionados resultó en el mantenimiento o aumento del peso del músculo sóleo y del músculo gastrocnemio. Se observó una reducción en el nivel de HbA1c en sangre en los grupos tratados con los péptidos seleccionados, lo que indica una mejor homeostasis de la glucosa.

En conclusión, el tratamiento con los péptidos seleccionados produjo una reducción dosis-dependiente del peso corporal y de la masa grasa, mientras que la masa muscular magra se mantuvo.

Ejemplo 11: Telemetría en ratones

Los resultados de la evaluación de la presión arterial y la frecuencia cardíaca en ratones tratados con la SEQ ID NO: 3 se pueden observar en la Fig. 6 y la Tabla 18, y en la Fig. 7 y la Tabla 19, respectivamente. El tratamiento con la SEQ ID NO: 3 produjo un efecto transitorio y dependiente de la dosis sobre la presión arterial media y un aumento permanente de la frecuencia cardíaca.

Tabla 18. Presión arterial media [mmHg]				
	Placebo	SEQ ID NO: 3		
Dosis [nmol/kg]	NA	10	30	100
Período oscuro de referencia	113.22 ± 4.9	117.13 ± 6.7	111.32 ± 3.0	108.55 ± 1.2
1. dosis	103.26 ± 5.6	97.23 ± 3.7	83.81 ± 3.9	83.22 ± 5.6
1. período oscuro	113.17 ± 6.0	102.19 ± 4.0	97.14 ± 2.8	86.82 ± 2.2*
2. dosis	101.11 ± 5.8	89.86 ± 2.5	89.68 ± 5.3	89.63 ± 4.9
2. período oscuro	112.49 ± 4.8	102.50 ± 2.9	102.00 ± 4.4	98.30 ± 4.8
3. dosis	97.77 ± 4.5	89.07 ± 1.9	93.98 ± 4.5	92.77 ± 4.1
3. período oscuro	112.94 ± 6.1	101.92 ± 1.5	106.02 ± 3.9	101.88 ± 5.1
4. dosis	96.31 ± 1.5	96.25 ± 1.4	94.91 ± 5.0	94.17 ± 3.4
4. período oscuro	104.23 ± 1.1	103.17 ± 1.7	106.67 ± 4.8	103.60 ± 5.3
5. dosis	97.71 ± 3.1	93.27 ± 1.8	94.31 ± 5.2	91.26 ± 2.0
5. Período oscuro	105.70 ± 1.2	105.59 ± 1.5	107.74 ± 5.7	103.68 ± 4.4
6. dosis	96.59 ± 2.0	99.01 ± 3.0	97.05 ± 6.6	88.76 ± 1.3*
6. Período oscuro	105.54 ± 1.0	104.54 ± 1.8	109.48 ± 6.3	103.45 ± 3.1
Prueba de Dunnett ANOVA bidireccional en comparación con Placebo: *: p < 0.05				

Tabla 19. Frecuencia cardíaca [lpm]				
	Placebo	SEQ ID. No. 3		
Dosis [nmol/kg]	N/A	10	30	100
Período oscuro de referencia	587.74 ± 19.3	573.24 ± 24.3	573.65 ± 26.2	581.49 ± 7.7
1. dosis	513.32 ± 17.3	590.34 ± 26.4	637.60 ± 39.0	692.31 ± 7.0***
1. período oscuro	569.85 ± 14.6	617.82 ± 17.8	636.57 ± 28.2	593.28 ± 23.1
2. dosis	517.13 ± 18.7	526.42 ± 18.4	534.13 ± 15.4	507.39 ± 8.1
2. período oscuro	573.19 ± 16.1	576.21 ± 15.5	579.68 ± 23.9	517.97 ± 16.2
3. dosis	501.98 ± 24.8	517.24 ± 12.1	524.21 ± 17.2	536.49 ± 10.4
3. período oscuro	565.64 ± 14.8	570.38 ± 9.8	621.30 ± 9.5*	591.77 ± 7.0
4. dosis	498.38 ± 22.6	521.88 ± 17.1	576.95 ± 21.0	560.41 ± 16.0
4. período oscuro	534.03 ± 16.2	557.65 ± 11.8	650.03 ± 9.0***	606.21 ± 10.1*
5. dosis	516.13 ± 24.7	515.46 ± 3.8	552.59 ± 12.9	554.35 ± 15.3
5. Período oscuro	533.44 ± 16.7	548.23 ± 8.3	628.77 ± 14.9**	619.17 ± 11.0**
6. dosis	510.36 ± 30.8	538.37 ± 13.6	558.58 ± 15.1	550.11 ± 16.2
6. Período oscuro	538.80 ± 14.2	571.18 ± 17.4	625.92 ± 11.6**	612.05 ± 11.8**
Prueba de Dunnett ANOVA bidireccional en comparación con Placebo: *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001				

Ejemplo 12: Telemetría en ratas

Los resultados de la telemetría en ratas se pueden ver en la Fig. 8 y en las Tablas 20 y 21. El tratamiento con la SEQ ID NO: 3 produjo una disminución transitoria y dependiente de la dosis de la presión arterial acompañada de un aumento transitorio y dependiente de la dosis de la frecuencia cardíaca.

Tabla 20. Presión arterial media [mmHg]			
	Placebo	SEQ ID NO:3	
Dosis [nmol/kg]	NA	10	30
Día -1	146.17 ± 1.2	145.33 ± 3.1	148.88 ± 3.1
Día 0	145.67 ± 1.7	130.83 ± 2.1***	126.25 ± 2.5****
Día 1	146.00 ± 1.4	130.33 ± 1.8****	130.00 ± 2.4****
Día 2	146.00 ± 1.6	136.17 ± 2.0*	141.00 ± 3.1
Día 3	138.50 ± 1.9	139.17 ± 2.3	142.50 ± 2.7
Día 4	145.33 ± 1.6	137.67 ± 2.4	141.00 ± 3.1
Día 5	147.00 ± 2.0	139.00 ± 2.9	141.75 ± 2.6
Día 6	146.50 ± 1.7	138.50 ± 2.4	141.75 ± 2.7
Prueba de Dunnett ANOVA bidireccional en comparación con placebo: *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001, ****: p < 0.0001			

Tabla 21. Frecuencia cardíaca [lpm]			
	Placebo	SEQ ID NO:3	
Dosis [nmol/kg]	N/A	10	30
Día -1	331.00 ± 6.5	314.50 ± 4.8	322.38 ± 5.9
Día 0	332.17 ± 6.7	345.67 ± 5.3	364.50 ± 5.4***
Día 1	340.50 ± 6.5	330.67 ± 6.2	334.00 ± 4.8
Día 2	335.50 ± 5.6	324.00 ± 5.2	327.50 ± 2.7
Día 3	352.67 ± 7.1	324.00 ± 5.2**	325.88 ± 4.2**
Día 4	345.50 ± 4.7	323.33 ± 7.4*	325.38 ± 6.4*
Día 5	340.00 ± 5.8	320.50 ± 7.0	323.50 ± 5.5
Día 6	331.67 ± 6.9	315.67 ± 7.2	328.88 ± 5.8
Prueba de Dunnett ANOVA bidireccional en comparación con Placebo: *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001			

Ejemplo 13: Telemetría en cerdos

Se evaluaron los efectos hemodinámicos del tratamiento con un régimen de dosis ascendente (estudio A, Figs. 9A a 9F) o con dosis única repetida (estudio B, Figs. 10A a 10F) de la SEQ ID NO: 3, tal

como se describe en el procedimiento general. Solo se incluyeron en el análisis los animales que mostraron señales físicas precisas.

En el estudio A, el tratamiento con la SEQ ID NO: 3 produjo efectos inotrópicos positivos de larga duración, mientras que la relajación del ventrículo izquierdo no se vio afectada. La frecuencia cardíaca y la presión arterial media permanecieron inalteradas. Se observó una ligera disminución del intervalo PR, pero el intervalo QT no se vio afectado. No se observaron hallazgos relevantes en la hemodinámica sistémica o cardíaca, según lo medido por la presión telediastólica del ventrículo izquierdo, la constante de tiempo de relajación, la sensibilidad de los barorreceptores y la variabilidad de la frecuencia cardíaca. Se observaron hallazgos similares en el estudio B. En conclusión, la SEQ ID NO: 3 indujo efectos inotrópicos positivos de larga duración sin hallazgos relevantes para la seguridad.

Ejemplo 14: Efectos agudos de un péptido seleccionado sobre la hemodinámica en cerdos anestesiados.

Los efectos agudos de dosis crecientes de la SEQ ID NO: 215 sobre la hemodinámica en cerdos anestesiados pueden observarse en las FIGs. 11A a 11D.

Como se observa en los estudios de telemetría, el tratamiento con la SEQ ID NO: 215 produce efectos inotrópicos positivos (Fig. 11A). Esto se asocia con un aumento del flujo sanguíneo coronario (Fig. 11B) y del consumo de O₂ (Figs. 11C y 11D), similar al observado con el tratamiento con dobutamina.

En conclusión, la SEQ ID NO: 215 mostró efectos inotrópicos robustos.

Ejemplo 15: Modelo de isquemia miocárdica en ratas

El efecto de la SEQ ID NO: 3 sobre el infarto de miocardio se evaluó según el procedimiento general. Los resultados de dos meses de tratamiento se pueden consultar en la Tabla 22.

Tres meses después del infarto de miocardio (MI), dos meses después de la inducción del tratamiento, el grupo MI-vehículo mostró disfunción ventricular izquierda con una reducción en la fracción de eyección y el acortamiento fraccional. Además, los animales MI-vehículo presentaron una disminución significativa en el volumen sistólico y el gasto cardíaco en comparación con los animales sometidos a cirugía simulada. Esto se asoció con un aumento significativo en el parámetro diastólico: tiempo de relajación isovolumétrica. Las ratas tratadas con la SEQ ID NO: 3 mostraron una mejor función cardíaca en comparación con los animales MI tratados con vehículo, con mejoras significativas en la fracción de eyección, el acortamiento fraccional, el volumen sistólico y el gasto cardíaco. En comparación, el tratamiento de control (A+L+S) solo mejoró la fracción de eyección y el acortamiento fraccional en comparación con los animales MI tratados con vehículo.

La presión arterial media y la frecuencia cardíaca, medidas en ratas anestesiadas antes de la finalización del experimento, se redujeron en los animales con infarto de miocardio en comparación con los animales sometidos a cirugía simulada. El tratamiento no influyó en estos parámetros hemodinámicos.

Al finalizar el tratamiento, los animales tratados con la SEQ ID NO: 3 pesaron significativamente más que los animales MI-tratados con vehículo. Esto se asoció con un aumento significativo de la masa muscular.

Tabla 22					
	Simulado	MI-Vehículo	MI - A+L+S	MI – SEQ ID NO: 3	
Dosis	NA	NA	1-1-10 mg/kg	30 nmol/kg	100 nmol/kg
Modo B de EF [% ± SEM]	80.93 ± 0.9####	38.74 ± 1.9	43.78 ± 0.9*	45.52 ± 1.2***	45.55 ± 0.7***
Modo M de EF [% ± SEM]	84.15 ± 1.2####	39.24 ± 1.5	44.46 ± 0.9**	46.42 ± 1.2****	46.22 ± 0.7***
FS [% ± SEM]	48.46 ± 1.4####	16.89 ± 0.7	19.55 ± 0.5**	20.63 ± 0.5****	20.46 ± 0.4***
VS [ml ± SEM]	0.41 ± 0.02###	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.41 ± 0.01****	0.40 ± 0.02****
CO [ml/min ± SEM]	144.8 ± 6.3####	112.6 ± 3.4	115.8 ± 4.6	129.0 ± 5.1*	125.4 ± 3.8
IVRT [ms ± SEM]	19.25 ± 0.5####	24.8 ± 0.5	22.67 ± 0.5	21.81 ± 0.5*	20.87 ± 0.3****
LVIDd [mm ± SEM]	8.03 ± 0.2####	10.99 ± 0.2	10.43 ± 0.1	10.86 ± 0.2	10.94 ± 0.1
LVID [mm ± SEM]	4.12 ± 0.2####	9.15 ± 0.2	8.40 ± 0.1*	8.63 ± 0.2	8.71 ± 0.1
LVPWd [mm ± SEM]	1.83 ± 0.1#	1.60 ± 0.1	1.53 ± 0.04	1.84 ± 0.04**	1.63 ± 0.1
LVPW [mm ± SEM]	3.15 ± 0.05####	2.54 ± 0.1	2.55 ± 0.06	2.94 ± 0.05****	2.73 ± 0.05
Presión arterial media [mmHg]	127 ± 4.2##	103.0 ± 5.4	107.1 ± 3.0	109.9 ± 4.0	112.6 ± 4.3
Frecuencia cardíaca [lpm]	370.2 ± 8.7#	339.2 ± 8.3	355.0 ± 7.3	348.8 ± 6.7	353.2 ± 9.1
Peso corporal al finalizar el tratamiento [g ± SEM]	534.0 ± 10.2	505.5 ± 9.2	487.9 ± 11.3	550.1 ± 10.6**	551.6 ± 6.7**
Masa en el sóleo izquierdo [mg ± SEM]	239.3 ± 15.5	233.5 ± 5.4	228.0 ± 7.4	274.9 ± 9.9**	275.2 ± 6.8**
Prueba t: #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 en comparación con MI-Vehículo. ANOVA: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 en comparación con MI-Vehículo. Abreviaturas: CO; gasto cardíaco, EF; fracción de eyección, FS; acortamiento fraccional, IVRT; tiempo de relajación isovolumétrica, LVID(d/s); diámetro interno del ventrículo izquierdo (fin de diástole, fin de sístole), LVPW(d/s); dimensión de la pared posterior del ventrículo izquierdo (fin de diástole, fin de sístole), SV; volumen sistólico.					

En conclusión, el tratamiento con la SEQ ID NO: 3 mejoró la función cardíaca en un modelo de infarto de miocardio en ratas.

Ejemplo 16: IRI subcrónica en ratones

Los resultados del tratamiento con la SEQ ID NO: 3 en el modelo uIRI en ratones se pueden observar en la Tabla 23. La inducción de uIRI aumentó los niveles séricos de creatinina, así como la lesión tubular renal (KIM-1), la inflamación (F4/80) y la fibrosis (Col1a1) en comparación con los animales

sometidos a cirugía simulada. El tratamiento con la SEQ ID NO: 3 (100 nmol/kg) redujo los niveles séricos de creatinina, la fibrosis renal y la inflamación en comparación con los animales uIRI tratados con el vehículo.

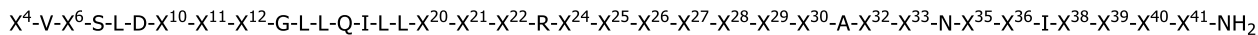
Tabla 23

	Simulado- Vehículo	uIRI - Vehículo	uIRI – SEQ ID NO. 3	
Dosis [nmol/kg]	SEM	SEM	30	100
Peso corporal al finalizar el tratamiento [g ± SEM]	22.3 ± 0.5	22.9 ± 0.5	24.4 ± 0.5	21.8 ± 0.4
Peso del riñón al finalizar el tratamiento [g ± SEM]	0.14 ± 0.005*	0.17 ± 0.008	0.16 ± 0.005	0.16 ± 0.006
Creatinina sérica [mg/dl]	0.17 ± 0.001***	1.97 ± 0.06	1.83 ± 0.004	1.17 ± 0.13***
Urea sérica [mg/dl]	138 ± 2.8***	484.0 ± 11.6	463.0 ± 10.5	433 ± 22.5
Fibrosis renal, Col1a1 [porcentaje de área fraccionaria]	7.41 ± 0.6***	37.7 ± 2.2	34.3 ± 2.3	26.4 ± 1.4***
Inflamación renal, F4/80 [fracción de área %]	0.05 ± 0.6***	6.6 ± 0.6	7.3 ± 0.6	2.5 ± 0.6***
Lesión renal, KIM-1 [porcentaje de área fraccionaria]	0.0425 ± 0.04***	7.47 ± 0.51	7.48 ± 0.49	6.00 ± 0.50
Prueba de Dunnett para el modelo lineal de un factor comparado con el vehículo DIO: *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001				

En conclusión, el tratamiento con la SEQ ID NO: 3 mejoró los parámetros evaluados de la función renal en un modelo de ratón con uIRI.

PUNTOS

1. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que comprende la estructura de la Fórmula (I)



(I)

donde

X⁴ se selecciona como I, Mel o P; X⁶ se selecciona como L o T; X¹⁰ se selecciona como Cle o V; X¹¹ se selecciona como P o Hyp; X¹² se selecciona como I o L; X²⁰ se selecciona como E, A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T, D, P, W, Y o V; X²¹ se selecciona como Q, E o L; X²² se selecciona como A o E; X²⁴ se selecciona como A o E; X²⁵ se selecciona como R, E o K; X²⁶ se selecciona como A, E o L; X²⁷ se selecciona

como A, E o K; X^{28} se selecciona como R, E o K; X^{29} se selecciona como E o K; X^{30} se selecciona como Q o R; X^{32} se selecciona como T o K; X^{33} se selecciona como T, E, K, V, Y, W, S, P, F, L, I, H, G, Q, A o Aib; X^{35} se selecciona como A, E, W, T, S, F, K, L, H, G, Q, D, N, R, Aib, L, I o V; X^{36} se selecciona como R o E; X^{38} se selecciona como L o Nle; X^{39} se selecciona como A o E; X^{40} se selecciona como R, E o K; X^{41} es V o I; y en el que solamente uno de X^{20} , X^{25} , X^{27} , X^{28} , X^{29} , X^{32} , X^{33} , o X^{40} se selecciona como K, y en el que la K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; y además, en el que al menos dos de X^{21} , X^{22} , X^{24} , X^{25} , X^{26} , X^{27} , X^{28} , X^{33} , X^{35} , X^{36} , X^{39} , y X^{40} se seleccionan como E.

2. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según el punto 1, donde X^{33} se selecciona como T, E, K o Aib; X^{35} se selecciona como A, Aib, L, I o V, y donde X^{35} se selecciona como Aib, L, I o V si X^{33} es T, o donde X^{33} se selecciona como E, K o Aib, donde K se lipidiza opcionalmente a través de un enlazador/espaciador si X^{35} es A.

3. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos anteriores, donde X^{38} se selecciona como Nle.

4. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según el punto 3, en el que uno de X^{20} , X^{21} , X^{26} , X^{30} o X^{41} se selecciona de la siguiente manera; X^{20} se selecciona como A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V; X^{21} se selecciona como L; X^{26} se selecciona como L; X^{30} se selecciona como R; o X^{41} se selecciona como I.

5. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según el punto 3, en el que X^{20} se selecciona como A, F, G, H, I, K, L, N, Q, R, S, T o V, preferiblemente X^{20} se selecciona como N, F, G, K, Q, S o T, preferiblemente X^{20} se selecciona como S.

6. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según el punto 5, donde X^{21} se selecciona como Q; X^{26} se selecciona como A; X^{30} se selecciona como Q; y X^{41} se selecciona como V.

7. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos anteriores, en el que solamente uno de X^{32} o X^{33} se selecciona como K, donde K está lipidado opcionalmente a través de un enlazador/espaciador; X^{25} se selecciona como R o E; X^{27} se selecciona como A o E; X^{28} se selecciona como R o E; X^{29} se selecciona como E; X^{40} se selecciona como R o E.

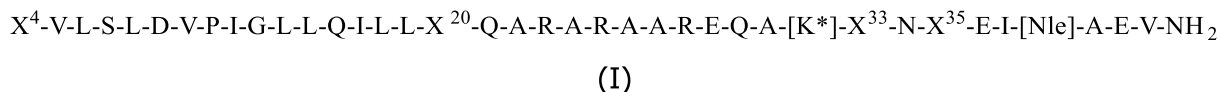
8. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos anteriores, en el que al menos dos de X^{22} , X^{33} , X^{36} y X^{40} se seleccionan como E; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{24} se selecciona como A; X^{25} se selecciona como R; X^{26} se selecciona como A o L; X^{27} se selecciona como A; X^{28} se selecciona como R; y X^{39} se selecciona como A.

9. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos anteriores, donde X^{36} y X^{40} se seleccionan como E; X^{21} se selecciona como Q o L; X^{22} se selecciona como A; X^{24} se selecciona como A; X^{25} se selecciona como R; X^{26} se selecciona como A o L; X^{27} se selecciona como A; X^{28} se selecciona como R; y X^{39} se selecciona como A.

10. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos anteriores, donde X^4 se selecciona como Mel o P; X^6 se selecciona como L; X^{10} se selecciona como V; X^{11} se selecciona como P; y X^{12} se selecciona como I.

11. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos anteriores, donde X^{29} se selecciona como E; y X^{30} se selecciona como Q.

12. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según el punto 1, que comprende la estructura de la Fórmula (I)



donde X^4 se selecciona como Met o P; X^{20} se selecciona como N, F, G, K, Q, S o T, preferiblemente X^{20} se selecciona como S; X^{33} se selecciona como T o Aib; X^{35} se selecciona como A o Aib; y además, donde X^{35} se selecciona como Aib, si X^{33} es T, o donde X^{33} se selecciona como Aib, si X^{35} es A; * denota una unión covalente de un lípido, opcionalmente a través de un enlazador/espaciador, al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de lisina.

13. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según el punto 1, en el que el polipéptido comprende la secuencia seleccionada de la lista que consiste en [Met]VLSLDVPIGLLQILLSQARARAAREQA[K*]TN[Aib]EI[Nle]AEV(NH₂) (SEQ ID NO: 215), PVLSLDVPIGLLQILLSQARARAAREQA[K*][Aib]NAEI[Nle]AEV(NH₂) (SEQ ID NO: 238), [Met]VLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQAT[K*]NAEILAEV(NH₂) (SEQ ID NO: 6), o [Met]VLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQA[K*]TN[Aib]EILAEV(NH₂) (SEQ ID NO: 16), en el que el * denota una unión covalente de un lípido, opcionalmente a través de un enlazador/espaciador, al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de la lisina .

14. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos anteriores, en el que la relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ sea al menos 2000.

15. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos anteriores, para uso como medicamento.

16. Un polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el polipéptido comprende la secuencia [Met]VLSLDVPIGLLQILLSQARARAAREQA[K*]TN[Aib]EI[Nle]AEV(NH₂) (SEQ ID NO: 215), donde el * denota una unión covalente de un lípido, opcionalmente a través de un enlazador/espaciador, al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de lisina, o un derivado del mismo que tenga la secuencia SEQ ID NO: 215 con 1 o 2 desviaciones de aminoácidos.

17. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según el punto 16, en el que la desviación es una sustitución de aminoácidos, preferiblemente una sustitución de aminoácidos conservadora.

18. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos 16-17, en el que la(s) desviación(es) no está(n) presente(s) en ninguna de las posiciones de aminoácidos seleccionadas de X^{32} (es decir, K³²), X^{35} (es decir, Aib³⁵), X^{36} (es decir, E³⁶), X^{38} (es decir, Nle³⁸) y X^{40} (es decir, E⁴⁰).

19. El polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de los puntos anteriores, en el que la relación hCRHR1-EC₅₀/hCRHR2-EC₅₀ sea al menos 2,000.