
Desarrollo de fármacos peptidomiméticos relacionados con la colecistoquinina con actividad sobre el sistema nervioso central
Development of peptidomimetic medicines related to cholecystokenin with activity on the central nervous system

J. Del Río¹, A. Barber², A. Berjón², S. Ballaz², A. Fortuño², I. Artaiz¹

INTRODUCCIÓN

La colecistoquinina (CCK) está constituida por una familia de péptidos en que las distintas formas moleculares (CCK_{58S}, CCK_{39S}, CCK_{33S}, CCK_{22S}, CCK_{12S}, CCK_{8S}) se distribuyen a lo largo del tracto digestivo, médula espinal y amplias zonas del cerebro¹. Existen, al menos, dos subtipos de receptores que difieren en su perfil farmacológico: CCK_A, "tipo pancreático o alimentario", de localización preferentemente periférica y CCK_B, "tipo cerebral", ampliamente distribuido en el cerebro².

Las diversas e importantes funciones de la colecistoquinina en el organismo derivan de su acción endocrina (hormona), paracrina-neurocrina (mediador local) y sináptica (neurotransmisor). Su conocida acción reguladora sobre la fisiología gastrointestinal, tanto motora (inhibición del vaciado gástrico y contracción del esfínter pilórico y de la vesícula biliar, relajación del esfínter de Oddi y el esofágico inferior, y adaptación de la motilidad del intestino delgado y colon a la digestión) como secretora (secreción gástrica y, sobre todo, pancreática), parece deberse a la interacción del péptido con los recepto-

res del tipo CCK_A³. Además, hay pruebas experimentales que implican a la CCK en procesos más directamente dependientes del sistema nervioso central como la generación de ansiedad, la modulación de la actividad motora espontánea y la acción analgésica de los opiáceos, y como factor de saciedad⁴.

Al conocimiento del papel fisiológico de la CCK ha contribuido de forma importante el desarrollo reciente de algunos potentes antagonistas no peptídicos, capaces de prevenir distintas acciones del péptido tanto *in vitro* como *in vivo*. La gran variedad de agonistas y antagonistas de CCK descritos⁵⁻⁷, así como la caracterización de ambos tipos de receptores², han aportado importante información acerca de los requerimientos estructurales que deben tener los compuestos químicos para presentar afinidad por los receptores de CCK.

Debido a la importancia farmacológica, y terapéutica potencial de los antagonistas de CCK y al limitado uso clínico de los ya descritos, se ha estudiado la actividad como antagonistas de la CCK de nuevos productos no peptídicos sintetizados y

ANALES Sis San Navarra 1998, 21 (Supl. 3): 63-68.

1. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.
2. Departamento de Fisiología y Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra.

diseñados como tal por el Instituto de Química Médica Aplicada del CSIC de Madrid. Los objetivos del trabajo han sido:

Estudio del desplazamiento, por los compuestos, de la fijación del radioligando ($^3\text{H-CCK}_{88}$) a receptores CCK_A (en homogenizados de páncreas) y CCK_B (en corteza cerebral).

Estudios del antagonismo de los compuestos a la respuesta contráctil inducida por CCK_{88} y CCK_4 en preparados de músculo longitudinal-plexo mientérico de ileon de cobaya.

Seleccionados los compuestos que proporcionaron mejores resultados, realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitiesen comprobar su acción fisiológica en el organismo, como: liberación de α -amilasa en acinos pancreáticos, conducta ingestiva, actividad motora espontánea y capacidad ansiolítica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado ratas macho, Wistar (180-200 g), ratones macho Swiss (20-25 g) y cobayas Dunkin-Hartley (300-400 g) suministrados por el Centro de Investigación de Farmacología Aplicada (CIFA) de la Universidad de Navarra, con las normas GLP (Good Laboratory Practices).

Los estudios de fijación a receptores de CCK se han llevado a cabo con homogenizados de corteza cerebral (CCK_B) y de tejido pancreático (CCK_A) de rata, con técnicas basadas en la de Daugé y col⁸. El radioligando seleccionado fue $^3\text{H-CCK}_{88}$ (Amersham). Se ha medido la liberación de α -amilasa en suspensiones de acinos aislados según lo descrito por Peikin y col⁹ y Jensen y col¹⁰. La respuesta contráctil de la CCK_{88} y CCK_4 en ileon de cobaya, y su modificación ante la adición de antagonistas se ha verificado mediante la preparación muscular longitudinal con plexo mientérico-plexo mientérico de ileon de cobaya (ML-PM) según las técnicas descritas por Lucaites y col¹¹ y Dal Forno y col¹². Para los estudios *in vivo* de conducta ingestiva se ha utilizado un modelo de acceso restringido al alimento^{13,14}, y otro en que a animales saciados se les induce a la hiperfagia mediante la utilización de una dieta de cafetería¹⁵. En éste último, el efecto se valora en relación

con el antagonismo frente a la D(+)-fenfluramina. La actividad motora espontánea se midió mediante un sistema digital computerizado (vídeo, ordenador y programa MODT) que permite estimar la distancia recorrida por el animal durante el tiempo experimental. La actividad ansiolítica se ha estimado mediante el test de la caja de dos compartimentos en ratón¹⁶ y el test de Vogel¹⁷ en rata.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fijación a receptores de CCK

Se ha medido el desplazamiento de los nuevos compuestos y de los antagonistas de referencia a la fijación del radioligando a su receptor, tanto en homogenizados de corteza cerebral como de páncreas. En la tabla 1 se indican los resultados de mayor interés, expresados como valor de K_i de los 87 probados. Los de la serie E son los que presentan mayor afinidad por los receptores CCK_A (páncreas), destacando el E-3 ($K_i=0,62$ nM, de la misma magnitud que el devazepide), el E-7 ($K_i=7,4$ nM) y el E-22 ($K_i=3,7$ nM).

En corteza cerebral, los mejores compuestos han sido los pseudotetrapeptídicos de la serie C, entre los que pueden señalarse el C-18 ($K_i=18,5$ nM) y el C-19 ($K_i=6,1$ nM), cuyos valores de K_i se asemejan a los obtenidos con los antagonistas específicos de los receptores CCK_B L-365.260 y PD-135.158, 14,7 nM y 5,9 nM respectivamente.

Preparado de músculo longitudinal-plexo mientérico de ileon de cobaya

La CCK_{88} y la CCK_4 provocan en esta preparación respuestas contráctiles diferentes y de distinta cuantía que derivan de su interacción preferente con los receptores de tipo A y de tipo B respectivamente^{11,12}. El efecto de los distintos productos y antagonistas sobre la contracción inducida por CCK_{88} y CCK_4 permite diferenciar y confirmar su acción sobre uno u otro tipo de receptor. Los resultados (expresados como porcentaje de inhibición y como valor de pA_2), que pueden compararse en la misma tabla 1 con los de fijación a receptores, apoyan la validez de los productos

Tabla 1. Resultados de los estudios de los estudios de fijación a receptores de CCK (K_i) y del antagonismo a la respuesta contráctil de la CCK en músculo longitudinal-pleno mientérico (% Inhibición, p_{A2}) de los productos de más interés

Producto	K_i (nM) páncreas	K_i (nM) cerebro	% I (p_{A2}) CCK _{8S}	% I (p_{A2}) CCK ₄
CCK8S	0,52±0,04	2,8±0,15	-	-
devazepide	0,3±0,03	342±67	100 (7,3)	100 (6,3)
lorglumide	27,7±5,3	2007	-	-
L-365.260	294±25	14,7±1,3	85,1 (5,6)	100 (7,14)
PD-135.158	647±73	5,9±0,5	60 (4,5)	70,7 (8,1)
C-18	196	18,5	83,5	100
C-19	697	6,1	78,2 (5)	100 (8)
E-1	10,6±2	2728±273	85,7 (4,8)	71,5 (4,9)
E-3	0,62±0,05	>10.000	100 (6,9)	91,9 (5,7)
E-6	21,9	>10.000	10,5	6,4
E-7	7,4±1,7	3106±599	94,9 (6,2)	78 (4,8)
E-22	3,7	>10.000	100 (6,4)	100 (5,3)

E-7 y, sobre todo E-3, como antagonista de receptores CCK_A y el producto C-19 como antagonista CCK_B.

Estudios *in vitro*: efecto sobre la liberación de α -amilasa inducida por CCK8S en acinos pancreáticos

De acuerdo con los datos anteriores, los estudios se han centrado en los productos E-3 y E-7, utilizándose como antagonista de referencia el devazepide. El antagonismo del E-3 sobre la liberación de α -amilasa inducida por CCK_{8S} (CI_{50} =42,6 nM) es cuantitativamente equivalente al del devazepide (CI_{50} =50,8 nM), mientras que el E-7 presenta una capacidad de inhibición significativamente inferior (CI_{50} =287 nM). Ninguno de los compuestos ensayados presenta actividad intrínseca sobre la secreción de α -amilasa.

Estudios *in vivo*

Los estudios comportamentales en el animal se han limitado al producto E-3. En primer lugar, por sus buenas perspectivas como antagonista CCK_A y en segundo, por-

que en experimentos *ex vivo*, en los que se estudiaba la cinética de fijación al receptor pancreático tras la administración de E-3, se constataba que, la unión del radioligando estaba claramente disminuida. En cambio, ésto no se manifestaba con el producto al que los datos *in vitro* apuntan como excelente antagonista CCK_B, lo que sugiere que el producto C-19 no atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica. Por otra parte, se ha comprobado que la estabilidad del producto E-3 es equiparable a la del devazepide.

Los resultados de conducta ingestiva en rata con el modelo de acceso restringido al alimento demuestran que el compuesto E-3 inhibe el efecto anoréxico de la CCK_{8S} (Fig. 1A) (8 μ g/kg i.p., 5 min antes de la presentación del pienso) ya a la dosis menor ensayada (5 μ g/kg) y la reversión es prácticamente total a partir de 50 μ g/kg (el devazepide lo consigue a la de 25 μ g/kg). La utilización del modelo de Cooper¹⁵ con ratas saciadas a las que se inducía a la hiperfagia con una dieta de cafetería no permitió observar antagonismo frente a la

anorexia causada por D(+)-fenfluramina, ni del compuesto E-3, ni del devazepide.

Se ha comprobado que la administración de CCK_{8S} (20 µg/kg i.p., 5 min antes de la realización de la prueba) disminuye la actividad motora espontánea de animal (distancia recorrida durante 30 min) en un 64%. El devazepide revierte totalmente esa hipomotilidad ya a partir de la dosis de 10 µg/kg y el E-3, lo hace con la de 50 µg/kg (Fig. 1B).

La actividad ansiolítica se estimó tanto con el test de la caja de dos compartimentos en ratón, basado en la tendencia del animal a evitar los lugares fuertemente ilu-

minados, lo que se atenúa por compuestos ansiolíticos, como con el test de Vogel en la rata, basado en el antagonismo por ansiolíticos a la inhibición del comportamiento por un estímulo aversivo.

Con el primero, se estudió el perfil ansiolítico del E-3, devazepide y también del L-365.260 (antagonista CCK_B), dada la implicación de estos receptores en los procesos de ansiedad. La respuesta frente a los dos tipos de antagonistas fue acampañada, siendo efectivos a las dosis de 10 y 100 µg/kg (L-365.260) o sólo 100 µg/kg (devazepide) y no a la dosis inferior (2 µg/kg) y superior (1000 µg/kg). La aplicación del E-3, en cambio, era nula a la de

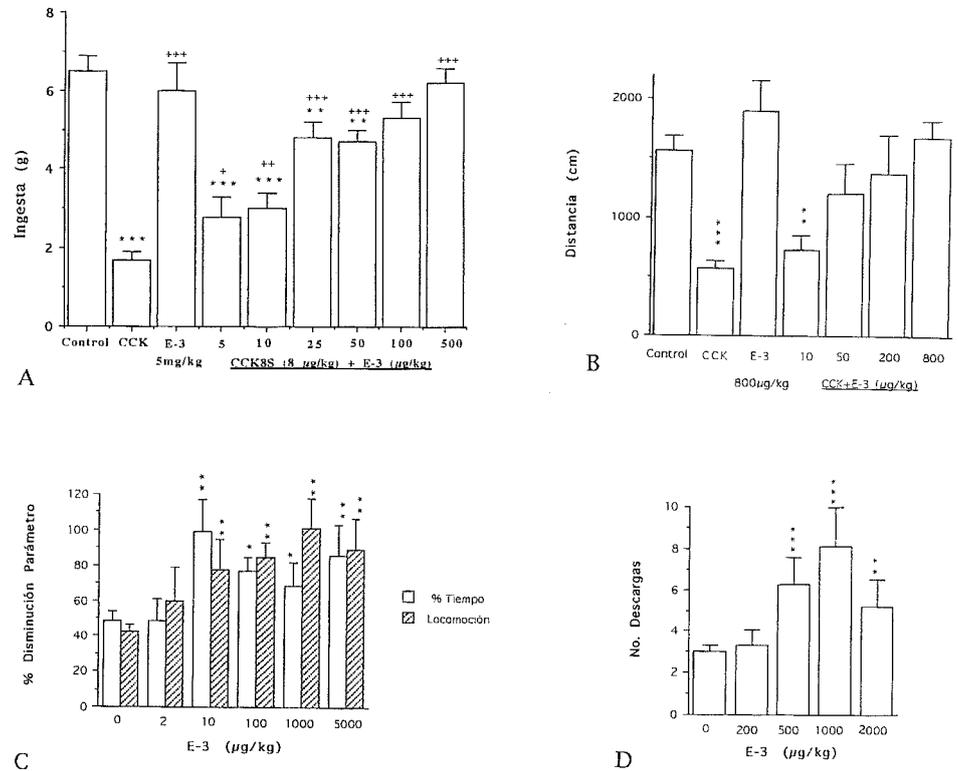


Figura 1. (A) Efecto del producto E-3 (10-100µg/kg) sobre la anorexia inducida por CCK_{8S} (8µg/kg), (B) efecto del compuesto E-3 (10-800 µg/kg) sobre la hipomotilidad inducida por CCK_{8S} (20µg/kg) en rata; (C) perfil ansiolítico del E-3 (2-500 µg/kg) en el test de la caja de dos compartimentos en ratón (parámetros estimados: % tiempo de permanencia y locomoción en el compartimento claro); (D) perfil ansiolítico del E-3 (200-2000 µg/kg) en el test de Vogel en rata. Significación de las diferencias (t-Student para datos no pareados) versus control normal (*) o control con CCK_{8S} (+): */+p<0,05, **/+p<0,01, ***/+++ p<0,001

menor dosis (2 µg/kg), pero se mantiene en el resto de las dosis ensayadas hasta la de 5000 µg/kg, lo que indica un margen de actuación mayor (Fig. 1C). Ninguno de los tres productos ensayados tuvo efectos sedantes a las dosis en las que los productos presentaban carácter ansiolítico. Con el test de Vogel, sigue observándose un efecto ansiolítico más pronunciado para el antagonista CCK_B L-365.260 (rango de dosis efectiva 10-100 µg/kg), que el del devazepide (efectivo a dosis de 200 µg/kg) y que el del E-3 (efecto a partir de 500 µg/kg) (Fig. 1D).

Del conjunto de resultados parece deducirse que efectivamente, se han conseguido nuevos compuestos de síntesis que pueden ser eficaces como antagonistas de la CCK, por interacción con receptores CCK_A y CCK_B. El producto E-3, específico de los receptores CCK_A, tiene una eficacia similar al devazepide y, por lo que respecta a su actividad como ansiolítico, su margen de eficacia podría no ser tan estrecho como el del devazepide.

Las conclusiones de este trabajo son:

1. De los 87 productos de nueva síntesis diseñados como antagonistas de la CCK, se han seleccionado dos series que destacan por su capacidad de desplazamiento de la fijación del radioligando ³H-CCK_{8s} a receptores CCK_A (páncreas) o CCK_B (corteza cerebral).

2. Los valores de K_i obtenidos en páncreas y corteza indican que el producto E-3 es un antagonista CCK_A con afinidad equivalente a la del devazepide e incluso con mayor especificidad.

3. Los productos C-18 y, sobre todo, C-19 presentan afinidad por los receptores CCK_B próxima a la de los antagonistas L-365.260 y PD-135.158.

4. La utilización de la preparación músculo longitudinal-plexo mientérico de íleon de cobaya permite corroborar la actividad como antagonista CCK_A o CCK_B de los productos en estudio.

5. Los ensayos de liberación de α-amilasa en preparados de acinos aislados de páncreas confirman la capacidad del pro-

ducto E-3 para inhibir la respuesta secretora debida a la CCK.

6. Los resultados obtenidos *in vivo* en rata y ratón (conducta ingestiva, motilidad espontánea, actividad ansiolítica) indican que el compuesto E-3 puede tener interés como antagonista en procesos en que estén implicados primordialmente los receptores CCK_A.

BIBLIOGRAFÍA

1. ENG J, SHIINA Y, STRAUSS E, YALOW RS. Post-translational processing of cholecystokinin in pig brain and gut. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 83: 4918-4922.
2. WANK SA. Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol* 1995; 269: G628-G646.
3. SILVENTE-POIROT S, DUFRESNE M, VAYSSE N, FOURMY D. The peripheral cholecystokinin receptors. *Eur J Biochem* 1993; 215: 513-529.
4. DOURISH CT, COOPER SJ, IVERSEN SD, IVERSEN LL. Multiple cholecystokinin in the CNS. Dourish CT, Cooper SJ, Iversen SD, Iversen LL eds. Oxford University Press 1992.
5. CHANG RSL, LOTTI VJ. Biochemical and pharmacological characterization of an extremely potent and selective nonpeptide cholecystokinin antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4923-4926.
6. HUGHES J, BODEN P, COSTALL B, DOMENEY A, KELLY E, HORWELL DC et al. Development of a class of selective cholecystokinin type B receptor antagonists having anxiolytic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6728-6732.
7. BÖHME GA, BLANCHARD JC. Les cholecystokinines et leurs récepteurs. Aspects fonctionnels. *Thérapie* 1992; 47: 541-548.
8. DAUGÉ V, BÖHME GA, CRAWLEY JN, DURIEUX C, STUTZMANN JM, FEGER J et al. Investigation of behavioural and electrophysiological responses induced by selective stimulation of CCK_B receptors by using a new highly potent analog: BC264. *Synapse* 1990; 6: 73-80.
9. PEIKIN SR, ROTTMAN AJ, BATZRI S, GADNER JD. Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. *Am J Physiol* 1978; 235: E743-E749.
10. JENSEN RT, LEMP GF, GADNER JD. Interactions of CCOH-terminal fragments of cholecystokinin with receptors on dispersed acini guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 1982; 257: 5554-5559.

11. LUCAITES VL, MENDELSON LG, MASON NR, COHEN ML. CCK-8, CCK-4 and gastrin-induced contractions in guinea pig ileum: evidence for differential release of acetylcholine and substance P by CCK-A and CCK-B receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 695-703.
 12. DAL FORNO G, PIETRA C, URCIOLI M, VAN AMSTERDAM F, TOSON G, GAURAGHI G *et al*. Evidence for two cholecystokinin receptor mediating the contraction of guinea pig ileum longitudinal-myenteric plexus. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261: 1056-1063.
 12. HEWSON G, LEIGHTON GE, HILL RG, HUGHES J. The cholecystokinin receptor antagonist L-365.718 increases food intake in the rat by attenuation of the action of endogenous cholecystokinin. *Br J Pharmacol* 1988; 93: 79-84.
 13. PONCELET M, ARNONE M, HEAULHUME M, GONALONS N, GUEYDET C, SANTUCCI V *et al*. Neurobehavioural effects of SR 27897, a selective cholecystokinin type A (CCK-A receptor antagonist). *Naunyn Arch Pharmacol* 1993; 348: 102-107.
 14. COOPER SJ, DOURISH CT, BABER DJ. Reversal of the anorectic of (+)-fenfluramine in the rat by the selective cholecystokinin receptor antagonist MK 329. *Brain J Pharmacol* 1990; 99: 65-70.
- CRAWLEY JN. Preliminary report of a simple animal behaviour model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1981; 13: 167-170.
- VOGEL JR, BEER B, CLODY DE. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacol* 1971; 21: 1-7.