



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 312**

51 Int. Cl.:

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02721604 .3**

96 Fecha de presentación : **28.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1379224**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2004**

54

Título: **Agonistas del receptor de ciclasa guanilato para el tratamiento de la inflamación tisular y la carcinogénesis.**

30

Prioridad: **29.03.2001 US 279438 P**
29.03.2001 US 279437 P
27.06.2001 US 300850 P
10.07.2001 US 303806 P
25.07.2001 US 307358 P
17.01.2002 US 348646 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2009

73

Titular/es: **Synergy Pharmaceuticals, Inc.**
Suite 450, 2 Executive Drive
Somerset, New Jersey 08873, US

72

Inventor/es: **Shailubhai, Kunwar;**
Nikiforovich, Gregory y
Jacob, Gary, S.

74

Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 330 312 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agonistas del receptor de ciclasa guanilato para el tratamiento de la inflamación tisular y la carcinogénesis.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la utilización terapéutica de agonistas de receptor de guanilato ciclasa como medio para incrementar la producción intracelular de GMPc. Los agonistas pueden utilizarse solos o en combinación con inhibidores de la fosfodiesterasa específica de GMPc, para la prevención o el tratamiento de tumores cancerosos, precancerosos o metastásicos, particularmente en el tracto gastrointestinal y en los pulmones. Además, los agonistas pueden utilizarse en el tratamiento de trastornos inflamatorios, tales como la colitis ulcerosa y el asma.

Antecedentes de la invención

15 La uroguanilina, la guanilina y los péptidos TE bacterianos son péptidos relacionados estructuralmente que se unen a un receptor de guanilato ciclasa y estimulan la producción intracelular de guanosina monofosfato cíclico (GMCC) (1-6). Ello resulta en la activación del regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR), un canal membranal apical para el flujo de salida de cloruro de los enterocitos de revestimiento del tracto intestinal (1-6). La activación del CFTR y el incremento posterior de la secreción transepitelial del cloruro conduce a la estimulación de la secreción de sodio y agua hacia la luz intestinal. Por lo tanto, al servir como reguladores paracrinos de la actividad del CFTR, los agonistas del receptor GMPc regulan el transporte de líquidos y electrolitos en el tracto GI (1-6; patente US 5.489.670).

25 El proceso de renovación epitelial implica la proliferación, migración, diferenciación, senescencia y pérdida final de las células GI en la luz (7,8). La mucosa GI puede dividirse en tres zonas diferenciadas basándose en el índice de proliferación de las células epiteliales. Una de estas zonas, la zona proliferativa, consiste de células madre no diferenciadas responsables de proporcionar una fuente constante de nuevas células. Las células madre migran hacia arriba, hacia el lumen, hacia el cual son extrudidas. A medida que migran, las células pierden su capacidad de dividirse y se diferencian para llevar a cabo funciones especializadas de la mucosa GI (9). La renovación de la mucosa GI es muy rápida, produciéndose la renovación completa en un periodo de 24 a 48 horas (9). Durante este proceso se restituyen las células mutadas y no deseadas por nuevas células. Por lo tanto, la homeostasis de la mucosa GI se encuentra regulada por el mantenimiento continuo del equilibrio entre las tasas de proliferación y de apoptosis (8).

35 Las tasas de proliferación celular y de apoptosis en el epitelio intestinal pueden incrementarse o reducirse en una amplia diversidad de circunstancias diferentes, por ejemplo en respuesta a estímulos fisiológicos, tales como el envejecimiento, señales inflamatorias, hormonas, péptidos, factores de crecimiento, compuestos químicos y hábitos dietéticos. Además, una tasa de proliferación incrementada se asocia frecuentemente a una reducción del tiempo de renovación y en una expansión de la zona proliferativa (10). Se ha observado que el índice de proliferación es mucho más elevado en los casos patológicos de colitis ulcerosa y en otros trastornos GI (11). De esta manera, la hiperplasia intestinal es el promotor principal de la inflamación y carcinogénesis gastrointestinales.

45 Además de un papel para la uroguanilina y la guanilina como moduladores de la secreción de líquido e iones intestinales, estos péptidos también podrían encontrarse implicados en la renovación continua de la mucosa GI. Los datos publicados anteriormente en la patente WO 01/25266 sugiere que un péptido con el dominio activo de la uroguanilina podría funcionar como inhibidor del desarrollo de pólipos en el colon y podría constituir un tratamiento para el cáncer de colon. Sin embargo, el mecanismo por el que se reivindica que se produce es cuestionable, en el aspecto de que la patente WO 01/25266 enseña péptidos agonistas de uroguanilina que se unen específicamente a un receptor de guanilato ciclasa denominado GC-C, que fue descrito por primera vez como el receptor de la enterotoxina termoestable (ST) de *E. coli* (4). Los ratones que carecen de dicho receptor de guanilato ciclasa muestran resistencia a la ST en el intestino, aunque los efectos de la uroguanilina y la ST no se encuentran alterados en el riñón *in vivo* (3). Estos resultados han sido corroborados adicionalmente por el hecho de que la despolarización membranal inducida por la guanilina resulta bloqueada por la genisteína, un inhibidor de tirosina quinasa, mientras que la hiperpolarización inducida por la uroguanilina no resultó afectada (12, 13). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que la uroguanilina también se une a un receptor actualmente desconocido que no es GC-C.

60 Otros artículos han informado de que la producción de uroguanilina y guanilina se reduce drásticamente en presencia de pólipos en el colon y de tejidos tumorales (14-17). Además, se ha demostrado que los genes para tanto uroguanilina como guanilina se localizan en regiones del genoma frecuentemente asociadas a la pérdida de heterocigosidad en el carcinoma de colon humano (18-20). Tomados conjuntamente, estos resultados indican que la uroguanilina, la guanilina y otros péptidos con actividad similar, podrían utilizarse en la prevención o en el tratamiento de crecimientos anormales en el colon. Esta propuesta se ha visto impulsada por un estudio reciente que demuestra que la administración oral de uroguanilina inhibe la formación de pólipos en ratones (15,16).

65 Los péptidos uroguanilina y guanilina aparentemente también estimulan la apoptosis mediante el control del flujo iónico celular. Las alteraciones de la apoptosis se han asociado a la progresión tumoral hacia el fenotipo metastásico. Aunque un cáncer gastrointestinal (GI) primario se encuentra limitado al intestino delgado, colon y recto, podría metastatizar y extenderse a sitios tales como huesos, nódulos linfáticos, hígado, pulmones, peritoneo, ovarios y cere-

bro. Mediante el incremento de la salida de K^+ y la entrada de Ca^{++} , la uroguanilina y péptidos relacionados podrían estimular la muerte de las células transformadas y de esta manera inhibir la metástasis.

Una de las manifestaciones clínicas de la actividad reducida del CFTR es la inflamación de las vías respiratorias (21). Este efecto podría deberse a la regulación por parte del CFTR de NF-KB, quimoquinas y citoquinas (22-25). Algunos informes recientes también han sugerido que el canal del CFTR se encuentra implicado en el transporte y mantenimiento de los niveles reducidos de glutatión, un antioxidante que desempeña un papel importante en la protección frente a la inflamación causada por el estrés oxidativo (39). El incremento de los niveles intracelulares del GMPc mediante la activación de la guanilato ciclasa o mediante la inhibición de la fosfodiesterasa específica de GMPc se esperaría que regulase negativamente estos estímulos inflamatorios. De esta manera, el agonista de tipo uroguanilina debería resultar útil en la prevención y el tratamiento de las enfermedades inflamatorias de los pulmones (por ejemplo el asma), el intestino (por ejemplo la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn), el páncreas y otros órganos.

Globalmente puede concluirse que los agonistas del receptor de la guanilato ciclasa, tales como la uroguanilina, presenta un potencial valor terapéutico en el tratamiento de una amplia diversidad de condiciones inflamatorias, cáncer (particularmente el cáncer de colon) y como agentes antimetastásicos. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos agonistas resulta de importancia clínica sustancial.

Shailubhai *et al.*, Cancer Research 60:5151-5157, 2000, informa de que el tratamiento de uroguanilina suprime la formación de pólipos en el ratón $Apc^{min/+}$ e induce la apoptosis en células de adenocarcinoma de colon humano mediante el GMP cíclico, la patente WO 01/25266 da a conocer la utilización de la uroguanilina como agente inhibidor del cáncer intestinal.

Descripción resumida de la invención

La presente divulgación se basa en el desarrollo de nuevos agonistas del receptor de guanilato ciclasa y en nuevos usos de agonistas naturales. Los agonistas son análogos de la uroguanilina, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, muchas de las cuales presentan propiedades superiores en términos de activación mejorada de receptores, estabilidad, actividad a pH reducido o menores efectos adversos. Los péptidos pueden utilizarse para tratar cualquier condición que responda a los niveles intracelulares incrementados de GMPc. Los niveles intracelulares de GMPc pueden incrementarse elevando la producción intracelular de GMPc y/o mediante la inhibición de su degradación por las fosfodiesterasas específicas de GMPc. Entre las condiciones específicas que pueden tratarse o prevenirse se encuentran las condiciones inflamatorias, el cáncer, los pólipos y la metástasis.

En su primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido según la reivindicación 1 (o a un conjugado del mismo según la reivindicación 11) y a composiciones terapéuticas que contienen dichos péptidos. El péptido más preferido es un biciclo que presenta la secuencia SEC ID NO:20.

Los péptidos pueden encontrarse en una composición farmacéutica en forma de dosificación unitaria, conjuntamente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a una única entidad de administración de fármaco, por ejemplo una tableta, cápsula, solución o formulación para inhalación. La cantidad de péptido presente debería ser suficiente para producir un efecto terapéutico positivo al administrarse en un paciente (típicamente entre 100 μ g y 3 g). Lo que constituye un "efecto terapéutico positivo" dependerá de la condición particular bajo tratamiento e incluirá cualquier mejora significativa en una condición fácilmente reconocida por un experto en la materia. Por ejemplo, puede constituir una reducción de la inflamación, un encogimiento de pólipos o de tumores, una reducción de lesiones metastásicas, etc.

También se encuentra contemplada la terapia de combinación que utiliza agonistas de receptor de guanilato ciclasa administrados solos o conjuntamente con un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc, un agente antiinflamatorio o un agente anticáncer. Estos agentes deberían encontrarse presentes en cantidades que es conocido por la técnica que resultan terapéuticamente eficaces al administrarse en un paciente. Entre los agentes antineoplásicos pueden incluirse agentes alquilantes, epipodofilotoxinas, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides vinca, antibióticos antraciclina, agentes mostaza nitrogenados y similares. Entre los agentes antineoplásicos particulares pueden incluirse tamoxifeno, taxol, etopósido y 5-fluorouracilo. Las terapias antivirales y de anticuerpos monoclonales pueden combinarse con composiciones quimioterapéuticas que comprenden por lo menos un agonista de receptor de guanilato ciclasa durante el diseño del régimen de tratamiento ajusto a las necesidades específicas del paciente.

Otro aspecto descrito en la presente memoria es la utilización de un péptido o conjugado de péptidos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, durante la preparación de un medicamento destinado a la prevención, tratamiento o retardo de la aparición de cáncer, particularmente de cáncer de células epiteliales o de pólipos, en un sujeto.

Asimismo, la invención se refiere a medicamentos destinados a la prevención o tratamiento de metástasis tumorales a partir de una masa de tumor primario. Las células de tumor metastásico que presentan receptores de guanilato ciclasa pueden ser la diana de los péptidos generados según la invención. En una realización preferente, el receptor diana se encuentra sobre células de cánceres gastrointestinales (GI) y sobre células metastatizadas derivadas de dichos cánceres. Dichos receptores son típicamente proteínas transmembranales con un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio que abarca la membrana, y un dominio intracelular con actividad de guanilato ciclasa. Aunque la invención no se encuentra limitada por ningún mecanismo de acción particular, se cree que los péptidos actuarán uniéndose a

dichos receptores celulares e induciendo la apoptosis. Los tumores metastásicos también pueden tratarse mediante la administración de cualquier forma conocida de uroguanilina o guanilina (preferentemente humana) o mediante la administración de péptido ST de *E. coli*.

5 Los péptidos pueden administrarse solos o conjuntamente con uno o más inhibidores de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc. Entre los ejemplos de los inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de GMPc se incluyen sulfinac sulfona, zaprinast y motapizona. Entre las formas tratables de cáncer se incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer renal y cáncer testicular. La carcinogénesis de colon puede evitarse mediante la inhibición del desarrollo de pólipos colorrectales precancerosos mediante
10 la administración de una composición según la invención. Se cree que los péptidos deberían resultar especialmente eficaces con respecto al tratamiento del cáncer de colon y en la prevención de la metástasis de los tumores de colon.

En un sentido más amplio, la invención se refiere a medicamentos para inducir la apoptosis en un paciente mediante la administración de una cantidad eficaz de un péptido según la reivindicación 1. Una "cantidad eficaz" de péptido, en
15 este sentido, se refiere a una cantidad suficiente para incrementar la apoptosis en un tejido diana. Por ejemplo, puede administrarse suficiente péptido para inducir una tasa incrementada de muerte celular en el crecimiento neoplásico.

El péptido más preferido para la utilización en los métodos indicados anteriormente es el péptido definido por la SEC ID NO:20. La secuencia es la siguiente (ver también la Tabla 3):
20

Asn¹ Asp² Glu³ Cys⁴ Glu⁵ Leu⁶ Cys⁷ Val⁸ Asn⁹ Val¹⁰ Ala¹¹ Cys¹² Thr¹³ Gly¹⁴ Cys¹⁵ Leu¹⁶ * * *

y en la que existe un enlace disulfuro entre la cisteína en la posición 4 y la cisteína en la posición 12, y un segundo enlace disulfuro entre la cisteína en la posición 7 y la cisteína en la posición 15 (SEC ID NO:20). Se ha encontrado
25 que este péptido presenta una actividad biológica incrementada como agonista de la producción de GMPc debido a su constante de unión incrementada para el receptor de guanilato ciclasa, y es superior a la uroguanilina con respecto a la temperatura y a la estabilidad de proteasa y con respecto a su actividad biológica en el intervalo de pH fisiológicamente favorable (pH 6 a 7) en el intestino grueso.

30 Los agonistas de receptor de guanilato ciclasa utilizados en los métodos indicados anteriormente pueden administrarse por vía oral, sistémica o localmente. Entre las formas de dosificación se incluyen las preparaciones para inhalación o inyección, soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, cápsulas, pomadas tópicas y lociones, composiciones transdérmicas, otras formulaciones de péptidos conocidas y análogos de péptidos pegilados. Una dosis eficaz de la composición típicamente se encontrará comprendida entre aproximadamente 1 μ g y aproximadamente 10 mg
35 por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 10 μ g y 5 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal. Se realizarán ajustes de la dosis utilizando métodos que son rutinarios de la técnica y se basan en la composición particular que se utiliza y en consideraciones clínicas. Los agonistas pueden administrarse como el agente activo único o en combinación con otros fármacos, por ejemplo un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc. En todos los casos deberían administrarse fármacos adicionales a una dosis que es terapéuticamente eficaz utilizando
40 la técnica preexistente como guía. Los fármacos pueden administrarse en una única composición o secuencialmente.

Descripción detallada de la invención y de la exposición

45 La presente divulgación se basa en varios conceptos. El primero es que existe un mecanismo dependiente de GMPc que regula el equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, y que una reducción de los niveles de GMPc, debido a una deficiencia de uroguanilina/guanilina y/o debido a la activación de las fosfodiesterasas específicas de GMPc, es una etapa temprana y crítica en la transformación neoplásica. Un segundo concepto es que la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos membranales, que conduce a la activación de PLA₂c, de COX-2 y posiblemente de la 5-lipooxigenasa durante el proceso de la inflamación, se encuentra regulado negativamente por un mecanismo dependiente de GMPc, conduciendo a niveles reducidos de prostaglandinas y leucotrienos, y que los niveles intracelulares
50 crecientes de GMPc, por lo tanto, pueden producir una respuesta antiinflamatoria. Además, se cree que un mecanismo dependiente de GMPc se encuentra implicado en el control de los procesos proinflamatorios. Por lo tanto, la elevación de los niveles intracelulares de GMPc podría utilizarse como medio para tratar y controlar las enfermedades intestinales inflamatorias, tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, y la inflamación de otros órganos (por ejemplo la asociada con el asma, la nefritis, la hepatitis, la pancreatitis, la bronquitis o la fibrosis quística).

Sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, se contempla que el transporte de iones a través de la membrana plasmática demuestre ser un importante regulador del equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, que resultará afectado por composiciones que alteran las concentraciones de GMPc. Se ha demostrado que la uroguanilina estimula el flujo de salida de K⁺, el flujo de entrada de Ca⁺⁺ y el transporte de agua en el tracto gastrointestinal (3). Además, el péptido natriurético atrial (ANP), un péptido que también se une a un receptor de guanilato ciclasa específico, también se ha demostrado que induce la apoptosis en células mesangiales de rata, y que induce la apoptosis en miocitos cardiacos mediante un mecanismo del GMPc (26-29). Se cree que la unión de los presentes agonistas
65 a un receptor de guanilato ciclasa estimula la producción de GMPc. Esta interacción ligando-receptor, a través de la activación de una cascada de proteínas quinasa-dependientes y CFTR seguidamente se espera que induzca la apoptosis en las células diana. Por lo tanto, la administración de los nuevos péptidos definidos por las secuencias SEC ID NOs:2-21, tal como se muestra en las Tablas 2 y 3, o la uroguanilina, o la guanilina o el péptido ST de *E. coli*, se espera que

elimine, o por lo menos retrase, la aparición de enfermedades inflamatorias del tracto GI y la inflamación general de órganos (por ejemplo asma, nefritis, hepatitis, pancreatitis, bronquitis y fibrosis quística).

En otro aspecto, la divulgación se refiere a la prevención, tratamiento o retraso de la aparición de cáncer, particularmente de cáncer de células epiteliales, en un sujeto en el que se administra una composición que comprende una cantidad eficaz de un agonista de receptor de guanilato ciclasa, preferentemente un agonista sintético de receptor de guanilato ciclasa. La expresión “cantidad eficaz” se refiere a suficiente agonista para incrementar mediblemente los niveles intracelulares de GMPc. El término “sintético” se refiere a un péptido creado para unirse a un receptor de guanilato ciclasa, pero que contiene determinadas sustituciones de secuencias de aminoácidos no presentes en agonistas de guanilato ciclasa endógenos conocidos, tales como la uroguanilina. El agonista debería ser un péptido seleccionado de entre aquellos definidos por las secuencias SEC ID NOs:2-21, y que se encuentran listados en las Tablas 2 y 3. También se encuentran comprendidos en la invención métodos para el tratamiento de cánceres primarios y metastásicos diferentes del cáncer de colon primario, mediante la administración de una dosis eficaz de un péptido seleccionado de entre el grupo que consiste de: uroguanilina, guanilina y péptido ST de *E. coli*. Puede utilizarse cualquier forma de uroguanilina o guanilina para este fin, aunque resultan preferentes los péptidos humanos.

El mecanismo dependiente de GMPc que regula el equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis en las células tumorales metastásicas puede servir como mecanismo para el reconocimiento y tratamiento de los tumores metastásicos. El hígado es el sitio más común de metástasis desde un cáncer colorrectal primario. Hacia los estadios tardíos de la enfermedad, las células colorrectales metastásicas también pueden invadir otras partes del cuerpo. Resulta importante indicar que las células metastásicas originadas en el sitio primario en el tracto gastrointestinal típicamente continúan expresando receptores de guanilato ciclasa y, por lo tanto, estas células deberían ser sensibles a la terapia de apoptosis mediada por los receptores intestinales de guanilato ciclasa. Los péptidos que presentan actividad de uroguanilina, en el caso de que se utilicen solos o en combinación con inhibidores específicos de fosfodiesterasa-GMPc, también retrasan la aparición de la carcinogénesis en el epitelio intestinal mediante la restauración de un equilibrio sano entre la proliferación celular y la apoptosis mediante un mecanismo mediado por GMPc.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “receptor de guanilato ciclasa” se refiere a la clase de receptores de guanilato ciclasa en cualquier tipo celular al que se unen los péptidos agonistas de la invención o los agonistas naturales indicados en la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “agonista de receptor de guanilato ciclasa” se refiere a péptidos y/o otros compuestos que se unen a un receptor de guanilato ciclasa y estimulan la producción de GMPc. La expresión también incluye todos los péptidos que presentan secuencias de aminoácidos sustancialmente equivalentes a por lo menos una porción del dominio de unión que comprende los residuos aminoácidos 3 a 15 de la secuencia SEC ID NO:1. Dicha expresión también cubre fragmentos y propéptidos que se unen al receptor de guanilato ciclasa y estimulan la producción de GMPc. La expresión “sustancialmente equivalente” se refiere a un péptido que presenta una secuencia de aminoácidos equivalente a la del dominio de unión, en la que determinados residuos pueden deleccionarse o sustituirse por otros aminoácidos sin alterar la capacidad del péptido para unirse a un receptor de guanilato ciclasa y estimular la producción de GMPc.

Estrategia y diseño de nuevos agonistas de receptor de guanilato ciclasa

La uroguanilina es un péptido secretado por las células caliciformes y otras células epiteliales de revestimiento de la mucosa gastrointestinal en forma de pro-uroguanilina, una forma funcionalmente inactiva. El propéptido humano posteriormente es convertido en el péptido de 16 aminoácidos funcionalmente activo indicado en la secuencia SEC ID NO:1 (secuencia de la uroguanilina humana, ver la Tabla 2) en la luz del intestino por proteasas endógenas. Debido a que la uroguanilina es un péptido resistente al calor, resistente a ácidos y resistente a la proteólisis, la administración oral o sistémica de este péptido y/o de otros péptidos similares a la secuencia SEC ID NO:1 del péptido de 16 aminoácidos funcionalmente activo pueden utilizarse eficazmente en los métodos de tratamiento.

Los péptidos similares, aunque diferentes, de la uroguanilina se indican posteriormente, incluyendo algunos que producen propiedades potenciadoras del GMPc superiores y/o otras características beneficiosas (por ejemplo una estabilidad mejorada frente a la temperatura, una estabilidad incrementada frente a proteasas o una actividad superior a pH preferentes) en comparación con los péptidos uroguanilina anteriormente conocidos. Los péptidos pueden utilizarse para inhibir la inflamación del GI y para tratar o prevenir la aparición de formaciones de pólipos asociadas con la inflamación del intestino. Los tejidos epiteliales susceptibles de formar células cancerosas también pueden someterse a tratamiento. Los agonistas de receptor de guanilato ciclasa indicados presentan las secuencias de aminoácidos mostradas en las Tablas 2 y 3. El “dominio de unión” para la interacción agonista-receptor incluye los residuos aminoácidos de 3 a 15 de la secuencia SEC ID NO:1.

Se aplicó modelado molecular al diseño de nuevos agonistas de receptor de guanilato ciclasa utilizando métodos detallados en (30). Dicho modelado consistió de cálculos de energía para tres compuestos que es conocido que interactúan con receptores de guanilato ciclasa, es decir, para la uroguanilina humana, biciclo [4,12; 7,15] Asn¹-Asp²-Asp³-Cys⁴-Glu⁵-Leu⁶-Cys⁷-Val⁸-Asn⁹-Val¹⁰-Ala¹¹-Cys¹²-Thr¹³-Gly¹⁴-Cys¹⁵-Leu¹⁶ (UG, SEC ID NO:1); guanilina humana, biciclo [4,12; 7,15] Pro¹-Gly²-Thr³-Cys⁴-Glu⁵-Ile⁶-Cys⁷-Ala⁸-Tyr⁹-Ala¹⁰-Ala¹¹-Cys¹²-Thr¹³-Gly¹⁴-Cys¹⁵ (GU, SEC ID NO:22) y enterotoxina termoestable pequeña de *E. coli*, triciclo [6,10; 7,15; 11-18] Asn¹-Ser²-Ser³-Asn⁴-Tyr⁵-Cys⁶-

ES 2 330 312 T3

Cys⁷-Glu⁸-Leu⁹-Cys¹⁰-Cys¹¹-Asn¹²-Pro¹³-Ala¹⁴-Cys¹⁵-Thr¹⁶-Gly¹⁷-Cys¹⁸-Tyr¹⁹ (ST, SEC ID NO:23). Se utilizaron las comparaciones geométricas de todas las posibles conformaciones de baja energía para la conformación bioactiva, es decir, para la conformación presumiblemente adoptada por GU, UG y ST durante la interacción con el receptor. Lo anterior permitió el diseño de nuevos análogos con una población conformacional significativamente incrementada de la conformación bioactiva a expensas de otras conformaciones de baja energía mediante la selección de sustituciones individuales para diversos residuos aminoácidos.

Los cálculos de energías se llevaron a cabo mediante la utilización de procedimientos progresivos (30). Se utilizó el campo potencial ECEPP/2 (31, 32), suponiendo una geometría rígida de valencias con enlaces peptídicos trans planos, incluyendo el de Pro¹³ en ST. Se permitió que variase el ángulo ω en Pro¹³. Se incluyeron generalmente los hidrógenos alifáticos y aromáticos en los centros atómicos unidos de tipo CH_n; los átomos H^α y los hidrógenos de amida se describieron explícitamente.

El esquema principal de cálculos implicaba varias etapas sucesivas. En primer lugar, se consideraron las secuencias de los dos fragmentos monocíclicos del modelo (tres fragmentos en el caso de ST), *Ac-cyclo* (Cysⁱ...-Cys^j)-NMe, en los que todos los residuos excepto Cys, Gly y Pro se sustituyeron por prolinas; los valores de i y j correspondían a las secuencias de GU, UG y ST. En esta etapa, se consideraron todas las combinaciones posibles de mínimos locales para el esqueleto peptídico para cada residuo aminoácido, es decir, los mínimos en el mapa de Ramachandran de tipos E, F, C, D, A y A* (según la notación en (33)) para el residuo Ala; de los tipos E*, F*, C*, D*, A, E, F, C, D y A* para el residuo Gly, y de los tipos F, C y A para Pro. Para cada conformación de esqueleto, se encontró una posibilidad óptima para cerrar un ciclo utilizando las funciones potenciales parabólicas, intrínseca del campo de fuerzas ECEPP, mediante la comprobación del perfil de energías de rotación en torno al ángulo dihédrico χ^1 para el residuo D-Cys.

En total se consideraron aproximadamente 180.000 conformaciones de los grupos cíclicos. A continuación, se seleccionaron los conformémeros que satisfacían el criterio $E - E_{\min} < \Delta E = 15$ kcal/mol y que diferían en más de 40° en por lo menos un valor de cualquier ángulo dihédrico del esqueleto (de entre aproximadamente 3.000 a 8.000 conformaciones para fragmentos de diferentes modelos). En la siguiente etapa, se solaparon las conformaciones seleccionadas de los fragmentos monocíclicos correspondientes, para crear posibles conformaciones de los fragmentos del modelo bicíclico (los fragmentos tricíclicos en el caso de ST). Típicamente este procedimiento rindió aproximadamente 20.000 a 30.000 conformaciones. Todas estas conformaciones se sometieron a un nuevo ciclo de cálculos de energía, que resultó en 191 conformaciones que satisfacían el criterio $E - E_{\min} < \Delta E = 20$ kcal/mol para el fragmento del modelo ST y en 6.965 conformaciones que satisfacían el mismo criterio para el fragmento del modelo GU/UG. Seguidamente, las cadenas laterales que faltaban en los fragmentos del modelo se restituyeron, y se llevaron a cabo nuevamente los cálculos de energías, optimizando los valores de ángulos dihédricos de los grupos de cadena lateral (excepto el ángulo λ_1 para los residuos de Cys) y de los grupos terminales del esqueleto antes de la minimización de la energía, con el fin de conseguir las disposiciones espaciales más favorables, utilizando un algoritmo descrito anteriormente (34). Para el fragmento 4 a 15 de UG, 632 conformaciones satisfacían el criterio de $\Delta E = 20$ kcal/mol; 164 de ellas satisfacían el criterio más restrictivo de $\Delta E = 12$ kcal/mol, que corresponde al criterio aceptado de 1 kcal/mol/residuo (30). La elongación posterior del fragmento 4 a 15 de UG hasta 3 a 16, y después hasta la molécula de UG completa se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento progresivo. Finalmente, se encontraron 31 conformaciones de esqueleto de UG que satisfacían el criterio de $\Delta E = 16$ kcal/mol.

La comparación geométrica entre conformémeros se llevó a cabo de la manera siguiente. Se evaluó el mejor ajuste en la superposición de los centros atómicos en un par de conformémeros con el fin de comprobar el nivel de similitud geométrica entre ellos, de acuerdo con (35). El criterio de similitud geométrica era el valor *rms*, que se calculó para un par de conformaciones A y B, de la manera siguiente:

$$\text{rms} = (1/N) \sum_{i=1}^N [(x_{A_i} - x_{B_i})^2 + (y_{A_i} - y_{B_i})^2 + (z_{A_i} - z_{B_i})^2]^{1/2},$$

en la que N es el número de pares de átomos C^α seleccionados para la superposición, y x, y y z son las coordenadas cartesianas. Mediante el criterio de similitud geométrica de $\text{rms} < 2.0$ Å, las conformaciones de energía baja del fragmento conformacional rígido 4 a 15 de UG se clasificaron en siete familias conformacionales. Una de ellas consistía de los mismos seis conformémeros que son similares tanto a 1UYA como a 1ETN; esta familia también contiene el conformémero de energía más baja de UG (1UYA y 1ETN son las estructuras 3D definidas experimentalmente de UG y ST, respectivamente, que es conocido que presentan actividad biológica alta (36, 37); las estructuras 3D se encontraban disponibles de la base de datos Protein Data Bank).

ES 2 330 312 T3

TABLA 1

Valores de ángulos dihédricos (en grados) para el esqueleto peptídico en la conformación "molde" de UG

Residuo	Ángulo	Nº de confórmero					
		1	3	9	22	25	27
Cys ⁴	Ψ	-37	-41	-40	-55	-38	-54
Glu ⁵	Φ	-71	-67	-72	-69	-68	-70
	Ψ	-50	-47	-48	-33	-43	-22
Leu ⁶	Φ	-86	-86	-85	-81	-88	-91
	Ψ	163	165	160	153	160	156
Cys ⁷	Φ	-79	-82	-79	-83	-79	-81
	Ψ	74	68	78	67	75	72
Val ⁸	Φ	-120	-114	-126	-124	-125	-128
	Ψ	-65	-57	-62	-55	-60	-64
Asn ⁹	Φ	-83	-95	-82	-88	-89	-82
	Ψ	119	113	134	118	111	116
Val ¹⁰	Φ	-84	-82	-97	-90	-82	-82
	Ψ	-21	-13	-16	-4	-15	-16
Ala ¹¹	Φ	-79	-86	-87	-89	-85	-80
	Ψ	-32	-21	-35	-35	-18	-27
Cys ¹²	Φ	-86	-92	-78	-79	-95	-90
	Ψ	-52	-53	-55	-57	-53	-54
Thr ¹³	Φ	-129	-121	-127	-119	-118	-130
	Ψ	111	153	141	155	141	119
Gly ¹⁴	Φ	-64	-78	-78	-80	-78	-68
	Ψ	83	64	68	62	67	78
Cys ¹⁵	Φ	-139	-160	-150	-156	-78	-131

Los ángulos dihédricos Φ y Ψ que determinan la forma 3D global de este fragmento de UG son similares (Tabla 1). Lo anterior permitió llevar a cabo un diseño preliminar de nuevos análogos destinados a estabilizar esta familia particular de conformaciones utilizando las limitaciones conocidas de conformacional local impuesta por los diversos tipos de aminoácidos.

Por ejemplo, es conocido que Gly es conformacionalmente más flexible en comparación con cualquier otro residuo L-aminoácido, debido a que Gly puede adoptar conformaciones con cualquiera de las cuatro combinaciones de signos para φ y Ψ , es decir, -,+; -,-; +,+; y +,-. La última combinación está estéricamente impedida para los L-aminoácidos, tal como Ala. Por lo tanto, la sustitución de Gly¹⁴ por Ala¹⁴ debería limitar la flexibilidad conformacional en la posición 14, conservando las conformaciones indicadas en la Tabla 1. Además, la sustitución por Aib (α -Me-Ala, di- α -metilalanina) debería limitar la flexibilidad conformacional local en dos regiones únicamente, es decir para -, - y +, +, siendo la primera compatible con los confórmeros de Ala1 en la Tabla 1. Por lo tanto, una sustitución más deseable es Aib¹¹.

ES 2 330 312 T3

En Pro, el valor de φ se fija en -75° ; este residuo también es similar a valina, según sus propiedades hidrofóbicas. Por lo tanto, Val¹⁰ puede sustituirse por Pro¹⁰, que añade limitaciones conformacionales más locales a los confórmers de UG en la Tabla 1. La sustitución por Pro también requiere que el residuo anterior presente únicamente valores positivos de Ψ ; Asn⁹ en la Tabla 1 satisface este requisito. El residuo de Pro ya existe en la posición correspondiente de ST. Todas las sustituciones sugeridas en la secuencia SEC ID NO:1 mostrada posteriormente (por ejemplo Pro¹⁰, Aib¹¹ o Ala¹⁴) no modifican la naturaleza química de los aminoácidos no alifáticos (tales como Asn, Asp o Thr), que pueden resultar importantes para la interacción real con el receptor. Las sustituciones anteriores deberían conducir únicamente a limitaciones conformacionales que desplacen el equilibrio conformacional en UG hacia la forma 3-D “molde” sugerida.

Basándose en las estructuras 3D indicadas en la Tabla 1, se definió un farmacóforo tridimensional para la uroguanilina, permitiendo la determinación de las distancias entre grupos funcionales de la uroguanilina que se cree interaccionan directamente con el receptor. Aquellos grupos que se cree interaccionan directamente con el receptor son grupos laterales de residuos en las posiciones 3, 5, 9 y 13 de la secuencia del esqueleto. Preferentemente, los residuos son Glu³, Glu⁵, Asn⁹ y Thr¹³, tal como se muestra en las secuencias SEC ID NO:2 y SEC ID NO:20. De esta manera, se describe un farmacóforo tridimensional de la uroguanilina en el que puede crearse la disposición espacial de las cuatro cadenas laterales de los residuos en las posiciones 3, 5, 9 y 13 de manera que las distancias entre ellas permita actividad biológica opcional. Dichas distancias (medidas como distancias entre átomos C _{β} de los residuos correspondientes) son las siguientes: entre 5,7 y 7,6 Å para la distancia de 3 a 5, entre 4,0 y 6,0 Å para 3 a 9, entre 7,7 y 8,3 Å para 3 a 13, entre 9,4 y 9,5 Å para 5 a 9, entre 9,4 y 9,5 Å para 5 a 13, y entre 5,8 y 6,3 Å para 9 a 13.

Las distancias anteriormente indicadas dependen únicamente de conformaciones del esqueleto peptídico. Sin embargo, en algunos casos, la conformación de las cadenas laterales mismas también resulta importante. Por ejemplo, los cálculos demostraron que no existe ninguna diferencia conformacional entre los esqueletos de UG (SP301), [Glu²]-UG (SP303), [Glu³]-UG (SP304) y [Glu², Glu³]-UG (SP302) en términos de sus conformaciones de baja energía. Sin embargo, existe una clara diferencia en las posiciones espaciales de los β -carboxilos de Asp y los γ -carboxilos de Glu en la posición 3. Es decir, los γ -carboxilos de los residuos Glu en la posición 3 se encuentran claramente estirados “hacia el exterior” del volumen de las moléculas a más distancia que el β -carboxilo correspondiente de los residuos de Asp. La observación anterior sugiere fuertemente que el grupo carboxilo negativamente cargado de la cadena lateral en la posición 3 interacciona específicamente con un sitio de unión cargado positivamente en el receptor; por lo tanto, los análogos que contienen Glu³ en lugar de Asp³ deberían ser más activos. Simultáneamente, para garantizar la eficiencia de esta interacción particular, el sistema completo de interacciones electrostáticas a larga distancia entre ligando y receptor deberían encontrarse bien equilibradas. Debido a que la cadena lateral en Glu² presenta más posibilidades conformacionales en comparación con la cadena lateral de Asp², dicho equilibrio puede encontrarse ligeramente modificado en SP302 (doble sustitución de las asparaginas por glutaminas) en comparación con SP304 (única sustitución de Asp³ por Glu³).

Los compuestos capaces de adoptar conformaciones de baja energía indicadas en la Tabla 1 se listan en la Tabla 2. Todos los compuestos son biciclos [4,12; 7,15].

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 330 312 T3

TABLA 2

5	1. Compuesto parental: uroguanilina
	SEC ID n°: 1Asn ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶
	2. Compuestos sin modificaciones de cisteínas:
10	Secuencia común (SEC ID n° 2): Asn ¹ -Aaa ² -Bbb ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Xxx ¹⁰ -Yyy ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Zzz ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶ En la que Aaa=Asp, Glu; Bbb=Asp, Glu Con la excepción de que Aaa y Bbb no sean ambas Asp en la misma molécula Y en la que Xxx=Val, Pro; Yyy=Ala, Aib; Zzz=Gly, Ala
15	3. Compuestos con mercaptoprolina (Mpt) sustituida en lugar de cisteína en la posición 7:
	Secuencia común (SEC ID n° 3): Asn ¹ -Aaa ² -Bbb ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Mpt ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Xxx ¹⁰ -Yyy ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Zzz ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶ En la que Aaa=Asp, Glu; Bbb=Asp, Glu En la que Xxx=Val, Pro; Yyy=Ala, Aib; Zzz=Gly, Ala
20	4. Compuestos con penicilaminas (β,β-dimetilcisteínas, Pen) sustituidas en lugar de las cisteínas:
	Secuencia común (SEC ID n° 4): Asn ¹ -Aaa ² -Bbb ³ -Kkk ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Lll ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Xxx ¹⁰ -Yyy ¹¹ -Mmm ¹² -Th ¹³ -Zzz ¹⁴ -Nnn ¹⁵ -Leu ¹⁶ En la que Aaa=Asp, Glu; Bbb=Asp, Glu En la que Xxx=Val, Pro; Yyy=Ala, Aib; Zzz=Gly, Ala Y Kkk, Lll, Mmm y Nnn son Cys o Pen (excepto que no todos sean Cys en el mismo confórmero)
25	5. Compuestos con puentes de lactamo sustituidos en lugar de los puentes disulfuro:
	Secuencia común (SEC ID n° 5): Asn ¹ -Aaa ² -Bbb ³ -Kkk ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Lll ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Xaxx ¹⁰ -Yyy ¹¹ -Mmm ¹² -Thr ¹³ -Zzz ¹⁴ -Nnn ¹⁵ -Leu ¹⁶ En la que Aaa=Asp, Glu; Bbb=Asp, Glu En la que Xxx=Val, Pro; Yyy=Ala, Aib; Zzz=Gly, Ala Y todas las combinaciones de los siguientes (Dpr es ácido diaminopropiónico): Kkk es Dpr y Mmm es Asp o Glu, Kkk es Asp o Glu, y Mmm es Dpr, Lll es Cys o Pen, Nnn es Cys o Pen, o: Lll es Dpr y Nnn es Asp o Glu, Lll es Asp o Glu, y Nnn es Dpr, Kkk es Cys o Pen, Mmm es Cys o Pen.
30	
35	
40	
45	

Algunos de los péptidos mostrados en la Tabla 2 contienen 16 residuos aminoácidos en los que los residuos cisteína forman puentes disulfuro entre Cys⁴ y Cys¹², y entre Cys⁷ y Cys¹⁵, respectivamente. Estos péptidos difieren de las secuencias peptídicas indicadas en la patente WO 01/25266 y están diseñados basándose en la conformación del péptido y en cálculos de energías.

Además, los péptidos, de longitud variable entre 13 y 16 aminoácidos, mostrados en la Tabla 3, están diseñados, basándose en cálculos de energías y estructuras tridimensionales, para estimular la estabilización del confórmero biológicamente activo y para minimizar o eliminar la interconversión en confórmeros biológicamente activos. Estos péptidos también están diseñados para estimular la estabilidad frente a la proteólisis y las temperaturas altas. El diseño de dichos péptidos implica modificaciones de los residuos aminoácidos que contienen cargas iónicas a valores inferiores del pH, tales como los ácidos glutámico y aspártico.

60

65

ES 2 330 312 T3

TABLA 3

5	SEC ID NO:6	X1 Glu Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
	SEC ID NO:7	X1 Glu Asp Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
	SEC ID NO:8	X1 Asp Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
	SEC ID NO:9	X1 Asp Asp Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
10	SEC ID NO:10	X1 Glu Glu Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
	SEC ID NO:11	X1 Asp Glu Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
	SEC ID NO:12	X1 Glu Asp Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
15	SEC ID NO:13	X1 Asp Asp Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
	SEC ID NO:14	X1 Glu Glu Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
	SEC ID NO:15	X1 Asp Glu Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
	SEC ID NO:16	X1 Glu Asp Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
20	SEC ID NO:17	Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
	SEC ID NO:18	Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys
25	SEC ID NO:19	X1 Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
	SEC ID NO:20	Asn Asp Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu
30	SEC ID NO:21	Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
35	X1 a X9 pueden ser cualquier aminoácido. Los puentes disulfuro se forman entre los residuos Cys en las posiciones 4 y 12, y entre 7 y 15, respectivamente. La secuencia SEC ID NO:18 representa el requisito de longitud mínima para que dichos péptidos se unan a un receptor de guanilato ciclasa.	

Composiciones y formulaciones farmacéuticas

Los agonistas de receptor de guanilato ciclasa de la presente invención (Tabla 2; SEC ID NOs:2 a 5, y Tabla 3; SEC ID NOs:6 a 21), así como uroguanilina, guanilina y/o enterotoxina bacteriana ST, pueden combinarse o formularse con diversos excipientes, vehículos o adyuvantes para la administración oral, local o sistémica. Las composiciones peptídicas pueden administrarse en soluciones, polvos, suspensiones, emulsiones, tabletas, cápsulas, parches transdérmicos, pomadas u otras formulaciones. Las formulaciones y formas de dosificación pueden prepararse utilizando métodos bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, A. Oslo (editor), Easton, PA, 1980).

Los inhibidores de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc pueden ser moléculas pequeñas, péptidos, proteínas u otros compuestos que evitan específicamente la degradación del GMPc. Entre los compuestos inhibidores se incluyen suldinac sulfona, zaprinast, motapizona y otros compuestos que bloquean la actividad enzimática de las fosfodiesterasas específicas de GMPc. Pueden combinarse uno o más de dichos compuestos con un agonista de receptor de guanilato ciclasa ejemplificado en las secuencias SEC ID NOs:2 a 21, uroguanilina, guanilina y péptido ST de *E. coli*.

La selección de portadores (por ejemplo solución salina tamponada con fosfato, o PBS) y otros componentes adecuados para la utilización en composiciones se encuentra perfectamente comprendida dentro del nivel de conocimientos del experto en la materia. Además de contener uno o más agonistas de receptor de guanilato ciclasa, dichas composiciones pueden incorporar portadores farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes que es conocido que facilitan la administración y/o incrementan la incorporación. También pueden utilizarse otras formulaciones, tales como microesferas, nanopartículas, liposomas, proteína o péptido pegilado y sistemas de base inmunológica. Entre los ejemplos se incluyen formulaciones que utilizan polímeros (por ejemplo polietilenglicol al 20% p/v) o celulosa, o formulaciones entéricas y análogos de péptido pegilado para incrementar la vida media y estabilidad sistémicas.

Métodos de tratamiento

El término "tratamiento" se refiere a la reducción o alivio de los síntomas en un sujeto, la prevención del empeoramiento o progresión de los síntomas, o la prevención del desarrollo de la enfermedad. Para un sujeto dado, la mejora de un síntoma, el empeoramiento, regresión o progresión del mismo, pueden determinarse mediante cualquier medición objetiva o subjetiva utilizada típicamente por un experto en la materia. La eficacia del tratamiento en el caso

del cáncer puede medirse en forma de mejora de la morbilidad o mortalidad (por ejemplo la prolongación de la curva de supervivencia de una población seleccionada). De esta manera, el tratamiento eficaz incluiría la terapia de una enfermedad preexistente, el control de una enfermedad mediante enlentecimiento o detención de la progresión de la misma, la prevención de la incidencia de la enfermedad, la reducción del número o de la severidad de los síntomas, o una combinación de los mismos. El efecto puede demostrarse en un estudio controlado utilizando uno o más criterios estadísticamente significativos.

La terapia de combinación con uno o más procedimientos médicos/quirúrgicos y/o por lo menos un agente quimioterapéutico adicional pueden ponerse en práctica conjuntamente con la invención. Entre otros agentes adecuados que resultan útiles en la terapia de combinación se incluyen los fármacos antiinflamatorios tales como, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios esteroideos o no esteroideos (NSAIDS), tales como la aspirina y similares. Los usos para prevenir o reducir la incidencia de la recaída también se consideran un tratamiento.

Entre los cánceres que se espere que respondan a las composiciones se incluyen los carcinomas de mama, colorrectal, pulmonar, ovárico, pancreático, prostático, renal, de estómago, vejiga, hígado, esofágico y testicular. Entre los ejemplos adicionales de enfermedades que implican tejidos cancerosos o precancerosos que deberían responder a un terapéutico que comprende por lo menos un agonista de receptor de guanilato ciclase se incluyen: carcinoma (por ejemplo de células basales, basoescamoso, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, *in situ*, de Krebs, de células de Merkel, pulmonar de células pequeñas o no pequeñas, indiferenciado de células pequeñas, papilar, bronquiolar, de células escamosas, de células transicionales, de Walker), leucemia (por ejemplo de células B, de células T, HTLV, linfocítico agudo o crónico, de mastocitos, mielóide), histiocitoma, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, plasmacitoma, reticuloendoteliosis, adenoma, adenocarcinoma, adenofibroma, adenolinfoma, ameloblastoma, angioqueratoma, hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, apudoma, branquioma, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoide, carcinosarcoma, cementoma, colangioma, colesteatoma, condrosarcoma, condroblastoma, cordoma, coristoma, craneofaringioma, crondroma, cilindroma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, cistosarcoma filodes, disgerminoma, ependinoma, sarcoma de Ewing, fibroma, fibrosarcoma, tumor de células gigantes, ganglioneuroma, glioblastoma, glomangioma, tumor de células granulosas, ginandroblastoma, hamartoma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangio-pericitoma, hemangiosarcoma, hepatoma, tumor de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, leiomioma, leiomiosarcoma, leucosarcoma, tumor celular de Leydig, lipoma, liposarcoma, linfangioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma, meduloblastoma, meningioma, mesenquimoma, mesonefoma, mesotelioma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, mixoma, mixosarcoma, neurilemoma, neuroma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neurofibromatosis, odontoma, osteoma, osteosarcoma, papiloma, paraganglioma, paraganglioma no cromafínico, pinealoma, rabiomioma, rabiomiosarcoma, tumor de células de Sertoli, teratoma, tumor de células de la teca, y otras enfermedades en las que las células se han convertido en displásicas, inmortalizadas o transformadas.

Puede administrarse un bolo de la composición durante un tiempo corto. Un programa de dosificación conveniente es de una vez al día para tratar, *inter alia*, uno de los estados de enfermedad anteriormente indicados. Alternativamente, la dosis diaria eficaz puede dividirse en múltiples dosis para fines de administración, por ejemplo, de dos a doce dosis al día. El nivel de dosis seleccionado para la utilización dependerá de la biodisponibilidad, actividad y estabilidad del compuesto, de la vía de administración, de la severidad de la enfermedad bajo tratamiento, y de la condición del sujeto que requiere tratamiento. Se encuentra contemplado que una dosis diaria será típicamente de entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 2 mg (por ejemplo entre aproximadamente 100 μg y 1 mg) del compuesto por kilogramo de peso corporal. La cantidad de compuesto administrada depende de factores conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, las propiedades químicas del compuesto, la vía de administración, la localización y el tipo de cáncer, y similares. El mamífero sujeto puede ser cualquier paciente animal o humano. De esta manera, se encuentran contemplados según la invención tratamientos tanto veterinarios como médicos.

A continuación, se describe adicionalmente la invención a partir del ejemplo siguiente.

Ejemplo

Materiales y métodos

Cultivo celular: se obtuvieron células de carcinoma de colon T84 humano de la American Type Culture Collection en el pase 52. Las células se cultivaron en una mezcla 1:1 de medio F-12 de Ham y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de feto bovino al 10%, 100 U de penicilina/ml y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina. Las células se alimentaron con medio fresco cada tres días y se dividieron a una confluencia de aproximadamente 80%.

Ensayo basado en células T84 para determinar los niveles intracelulares de GMPc. Los análogos peptídicos fueron sintetizados a medida por Multiple Peptides Systems, San Diego, CA, y por Princeton Biomolecules, Langhorne, PA. Se sometió a ensayo la actividad biológica de los péptidos sintéticos tal como se ha informado anteriormente (15). Brevemente, las monocapas confluyentes de células T-84 en placas de 24 pocillos se lavaron dos veces con 250 μl de DMEM que contenía HERPES 50 mM (pH 7,4) e isobutilmetilxantina (IBMX) 1 mM, seguido de incubación con análogos peptídicos (0,1 nM a 10 μM) durante 30 minutos. El medio se aspiró y la reacción se terminó mediante la adición de ácido perclórico al 3%. Tras la centrifugación y la neutralización con NaOH 0,1 N, el sobrenadante se utilizó directamente para las mediciones de GMPc utilizando un kit ELISA (Caymen Chemical, Ann Arbor, MI).

Resultados

Los péptidos mostrados en la Tabla 4 se sintetizaron a medida y se purificaron (>95% de pureza) utilizando un procedimiento publicado (38). Los análogos peptídicos se evaluaron en el ensayo basado en células T84 para su capacidad de incrementar los niveles intracelulares de GMPc. Tal como se muestra en la Tabla 4, SP304 (SEC ID NO:20) proporcionó el incremento más grande del nivel intracelular de GMPc de todos los análogos sometidos a ensayo. SP316 (SEC ID NO:21) fue el segundo más eficaz, mientras que las actividades biológicas de SP301, SP302 y SP303 fueron algo más débiles. Los análogos peptídicos SP306 y SP310 no se encontraban activos en el presente ensayo. Estos resultados indican que SP304 es el péptido más potente para incrementar el nivel del GMPc. Dichos resultados también sugieren que el residuo cisteína en la posición 7 no puede sustituirse con penicilamina como componente del enlace disulfuro [7,15], y que el residuo Asn en la posición 9 no puede modificarse por un Gln.

TABLA 4

Agonistas peptídicos evaluados para actividad biológica en el bioensayo de células T84

SEC ID NO:*	Código de compuesto	Nivel de GMPc** (pmoles/pocillo)
1	SP301	205
6	SP302	225
7	SP303	195
20	SP304	315
14	SP306	0
4	SP310	0
21	SP316	275

*los IDs de secuencia para SP301, SP304 y SP316 son las secuencias de aminoácidos precisas para estos análogos tal como se proporcionan en el texto.

**Nivel intracelular de GMPc observado en células T84 tras el tratamiento con una solución 1 micromolar del agonista de péptido respectivo durante 30 minutos. El valor observado para SP304 era estadísticamente significativo a $p > 0,5$.

Para examinar la estabilidad frente al calor, se calentaron a 95°C soluciones 10 micromolar de análogos peptídicos durante, como máximo, 90 minutos. En tiempos específicos durante el tratamiento, se sometieron a ensayo muestras para su actividad biológica en el ensayo basado en células T84. La actividad biológica de SP301, SP302, SP303 y SP304 no cambió significativamente tras 60 minutos de calentamiento. Tras 90 minutos, las actividades de SP301, SP302 y SP303 se redujeron a aproximadamente 80% de sus valores originales, mientras que la actividad biológica de SP304 permaneció inalterada. Lo anterior indica que SP304 es más estable frente a la desnaturalización por calor en comparación con los otros péptidos sometidos a ensayo. Basándose en cálculos de energías y en la estructura 3D, los presentes inventores esperaban que el grupo carboxilo cargado negativamente de la cadena lateral en la posición 3 de la secuencia SEC ID NO:1 interaccionase específicamente con un sitio de unión cargado positivamente sobre el receptor. En el caso en el que esta interacción puede potenciarse, los análogos que contienen Glu³ en lugar de Asp³ deberían ser más activos, tal como se encontró para SP304. Simultáneamente, para garantizar la eficiencia de dicha interacción particular, un sistema completo de interacciones electrostáticas a larga distancia entre ligando y receptor debería encontrarse bien equilibrado. Debido a que la cadena lateral de Glu² presenta más posibilidades conformacionales en comparación con la cadena lateral de Asp², este equilibrio podría encontrarse ligeramente modificado en SP302 (doble sustitución de las Asp por los Glu) en comparación con SP304 (sustitución única de Asp³ por Glu³). En efecto, la actividad biológica de SP304 es la más alta de entre los análogos evaluados.

También se sometieron a ensayo los péptidos sintéticos SP301, SP302, SP303 y SP304 para sus actividades a diferentes valores de pH del ensayo basado en células T84. Mientras que todos dichos péptidos mostraron una producción intracelular incrementada de GMPc a pHs comprendidos entre 5 y 7, SP304 mostró el incremento más grande en el intervalo comprendido entre 6,5 y 7. Resulta importante indicar que el pH fisiológico del intestino grueso se encuentra en un intervalo similar y, por lo tanto, SP304 se esperaría que resultase especialmente eficaz para el tratamiento del cáncer de colon.

Los presentes inventores también evaluaron los péptidos utilizados, solos o en combinación con inhibidores de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc (por ejemplo zaprinast o sulindac sulfona) en ensayos basados en células T84 para el incremento de los niveles intracelulares de GMPc. Las combinaciones de un inhibidor de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc con SP304 mostró un efecto drástico de incremento de los niveles de GMPc en estos experimentos. El péptido sintético SP304 incrementó sustancialmente el nivel de GMPc sobre el nivel alcanzado en presencia de

zaprinast o de sulindac sulfona por sí solos. El tratamiento de los pocillos con SP304 en combinación con Zaprinast o con sulindac sulfona resultó en incrementos sinérgicos de los niveles intracelulares de GMPc. Estos incrementos fueron estadísticamente significativos, con valores de $p < 0,5$. Estos datos indican que los tratamientos que combinaban un agonista péptido de un receptor de guanilato ciclasa con uno o más inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de GMPc resultan en un incremento más que aditivo de la concentración de GMPc.

Referencias

- 10 1. **Currie**, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:947-951 (1992).
2. **Hamra**, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10464-10468 (1993).
- 15 3. **Forte**, L., *Reg. Pept.* 81:25-39 (1999).
4. **Schulz**, *et al.*, *Cell* 63:941-948 (1990).
5. **Guba**, *et al.*, *Gastroenterology* 111:1558-1568 (1996).
- 20 6. **Joo**, *et al.*, *Am. J Physiol.* 274:G533-G3644 (1998).
7. **Evan**, *et al.*, *Nature* (London) 411:342-348 (2001).
8. **Eastwood**, G., *J. Clin. Gastroenterol.* 14:S29-33 (1992).
- 25 9. **Lipkin**, M. **Arch. Fr. Mal. Appl Dig.** 61:691-693 (1972).
10. **Wong**, *et al.*, *Gut* 50:21.2-217 (2002).
- 30 11. **Potten**, *et al.*, *Stem Cells* 15:82-93.
12. **Basoglu**, *et al.*, in: Proceedings of the Second FEPS Congress, June 29-July 4, 1999, Prague, Czech Republic., <http://www.lf2.cuni.cz/physiolres/feeps/basoglu.htm>.
- 35 13. **Sindic**, *et al.*, *J. Biol. Chem.* March 11, 2002, manuscript M110627200 (in press).
14. **Zhang** *et al.*, *Science* 276:1268-1272 (1997).
15. **Shailubhai**, *et al.*, *Cancer Res.* 60:5151-5157 (2000).
- 40 16. **Shailubhai**, *et al.*, In: Proceedings of the 1999 AACR·NCI·EORTC International Conference. Nov. 1999, Abstract# 0734.
17. **Cohen**, *et al.*, *Lab. Invest.* 78:101-108 (1998).
- 45 18. **Sciaky**, *et al.*, *Genomics* 26:427-429 (1995).
19. **Whitaker**, *et al.*, *Genomics* 45:348-354 (1997).
- 50 20. **Leister**, *et al.*, *Cancer Res.* 50:7232-7235 (1990).
21. **Cheng**, *et al.*, *Cell* 63:827-834 (1990).
22. **Welsh**, *et al.*, *Cell* 73:1251-1254 (1993).
- 55 23. **Weber**, *et al.*, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281(1):L71-78 (2001).
24. **Venkatakrishnan**, *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23(3):396-403 (2000).
- 60 25. **Hudson**, *et al.*, *Free Radic. Biol. Med* 30:1440-1461 (2001).
26. **Bhakdi**, *et al.*, *Infect. Immun.* 57:3512-3519 (1989).
27. **Hughes**, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:30567-30576 (1997).
- 65 28. **Cermak**, *et al.*, *Pflugers Arch.* 43:571-577 (1996).
29. **Wu**, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:14860-14866 (1997).

ES 2 330 312 T3

30. **Nikiforovich, G.**, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 44:513-531 (1994).
31. **Dunfield, et al.**, *J. Phys. Chem.* 82:2609-2616 (1978).
- 5 32. **Nemethy, et al.**, *J. Phys. Chem.* 87:1883-1887 (1983).
33. **Zimmerman, et al.**, *Biopolymers* 16:811-843 (1977).
34. **Nikiforovich, et al.**, *Biopolymers* 31:941-955 (1991).
- 10 35. **Nyburg, S.**, *Acta Crystallographica* B30 (part 1):251-253 (1974).
36. **Chino, et al.**, *FEBS Letters* 421:27-31 (1998).
- 15 37. **Schulz, et al.**, *J. Peptide Res.* 52:518-525 (1998).
38. **Klodt, et al.**, *J. Peptide Res.* 50:222-230 (1997).
- 20 39. **Shailubhai, I.**, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:261-268 (2002)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 330 312 T3

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO:2, en la que Glu se encuentra presente en la posición aminoácida 3, que se une a un receptor de guanilato ciclasa y estimula la producción de GMPc, y en donde dicho péptido es un biciclo (4,12; 7,15).
2. Péptido según la reivindicación 1, en donde dicho péptido es un biciclo (4,12; 7,15) que presenta la secuencia SEC ID NO:20.
3. Utilización en la preparación de una dosis eficaz de un medicamento destinado a la prevención o tratamiento de cáncer primario o metastásico, o de pólipos o para la inducción de apoptosis en células de un paciente, de un agonista de receptor de guanilato ciclasa que presenta la secuencia SEC ID NO:2 con Glu en la posición aminoácida 3, uniéndose dicho péptido a un receptor de guanilato ciclasa y estimulando la producción de GMPc, y en donde dicho péptido es un biciclo (4,12; 7,15).
4. Agonista de receptor de guanilato ciclasa, que presenta la secuencia SEC ID NO:2 con Glu en la posición aminoácida 3, uniéndose dicho péptido a un receptor de guanilato ciclasa y estimulando la producción de GMPc, y en donde dicho péptido es un biciclo (4,12; 7,15) para la utilización en la prevención o el tratamiento de cáncer primario o metastásico, o pólipos, o para la inducción de apoptosis en células de un paciente.
5. Utilización según la reivindicación 3, o el agonista de receptor de guanilato ciclasa según la reivindicación 4, en donde dicho péptido es un biciclo (4,12; 7,15) que presenta la secuencia SEC ID NO:20.
6. Utilización según la reivindicación 3 o la reivindicación 5, o el agonista de receptor de guanilato ciclasa según la reivindicación 4 ó 5, en donde dicho cáncer primario es un miembro seleccionado de entre el grupo que consiste de mama, colon, recto, pulmón, ovario, páncreas, vejiga, próstata, riñón o testículo.
7. Utilización según la reivindicación 3, o el agonista de receptor de guanilato ciclasa según la reivindicación 4, en donde el paciente también recibe la administración de por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste de: un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc; un agente antivírico; y un agente anticáncer.
8. Composición farmacéutica en forma de dosificación unitaria, que comprende un péptido agonista de receptor de guanilato ciclasa que presenta la secuencia SEC ID NO:2 con Glu en la posición aminoácida 3, uniéndose dicho péptido a un receptor de guanilato ciclasa, estimulando la producción de GMPc y en donde dicho péptido es un biciclo (4,12; 7,15) y en donde dicho péptido se encuentra presente en una cantidad terapéuticamente eficaz.
9. Composición farmacéutica en forma de dosificación unitaria según la reivindicación 8, que además comprende por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste de: un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc; un agente antivírico; y un agente anticáncer; en donde dicho compuesto o compuestos se encuentran presentes en una cantidad terapéuticamente eficaz.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, en donde la forma de dosificación unitaria se selecciona de entre el grupo que consiste de una tableta, una cápsula, una solución y una formulación para la inhalación.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9, que además comprende uno o más excipientes.
12. Conjugado de péptidos que comprende polietilenglicol (PEG) unido a un péptido que presenta la secuencia SEC ID NO:2 con Glu en la posición aminoácida 3, uniéndose dicho péptido a un receptor de guanilato ciclasa, estimulando la producción de GMPc y en donde dicho péptido es un biciclo (4,12; 7,15).
13. Utilización en la preparación de una cantidad eficaz de un medicamento para el tratamiento de cáncer, o pólipos en un paciente del conjugado de péptidos según la reivindicación 12.
14. Conjugado de péptidos según la reivindicación 12 para la utilización en el tratamiento de cáncer o pólipos en un paciente.
15. Utilización del agonista de receptor de guanilato ciclasa según la reivindicación 7, en la que dicho péptido es un péptido bicíclico (4,12; 7,15) que presenta la secuencia SEC ID NO:20.
16. Composición farmacéutica según la reivindicación 8 ó 9 ó 10 ó 11, en la que dicho péptido es un péptido bicíclico (4,12; 7,15) que presenta la secuencia SEC ID NO:20.
17. Conjugado de péptidos según la reivindicación 12, en el que dicho péptido es un péptido bicíclico (4,12; 7,15) que presenta la secuencia SEC ID NO:20.
18. Utilización según la reivindicación 13, o el conjugado de péptido según la reivindicación 14, en el que dicho péptido es un péptido bicíclico (4,12; 7,15) que presenta la secuencia SEC ID NO:20.

ES 2 330 312 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SYNERGY PHARMACEUTICALS

5 <120> AGONISTAS DE RECEPTOR DE GUANILATO CICLASA PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN DE TEJIDOS Y DE LA CARCINOGENÉISIS

10 <130> 81361/141030

<140>

<141>

15 <160> 23

<170> PatentIn ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 16

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> DISULFURO

30 <222> (4)..(12)

<220>

<221> DISULFURO

35 <222> (7)..(15)

<400> 1

	Asn	Asp	Asp	Cys	Glu	Leu	Cys	Val	Asn	Val	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys	Leu
40	1				5					10					15	

<210> 2

<211> 16

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

<220>

<221> DISULFURO

55 <222> (4)..(12)

<220>

<221> DISULFURO

60 <222> (7)..(15)

<220>

65 <221> MOD_RES

<222> (2)

<223> Asp o Glu

ES 2 330 312 T3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
5 <223> Asp o Glu

<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (10)
<223> Val o Pro

<220>
15 <221> MOD_RES
<222> (11)
<223> Ala o Aib

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (14)
25 <223> Gly o Ala

<400> 2

30 **Asn Xaa Xaa Cys Glu Leu Cys Val Asn Xaa Xaa Cys Thr Xaa Cys Leu**
 1 5 10 15

<210> 3
<211> 16
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

<220>
45 <221> DISULFURO
<222> (4)..(12)

<220>
50 <221> DISULFURO
<222> (7)..(15)

<220>
55 <221> MOD_RES
<222> (2)
<223> Asp o Glu

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> Asp o Glu
65

<220>

ES 2 330 312 T3

<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> Mpt
5
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)
10 <223> Val o Pro

<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (11)
<223> Ala o Aib

<220>
<221> MOD_RES
20 <222> (14)
<223> Gly o Ala

25 <400> 3

Asn Xaa Xaa Cys Glu Leu Xaa Val Asn Xaa Xaa Cys Thr Xaa Cys Leu
1 5 10 15
30
<210> 4
<211> 16
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa
40
<220>
<221> DISULFURO
<222> (4)..(12)
45
<220>
<221> DISULFURO
<222> (7)..(15)
50

<220>
<221> MOD_RES
55 <222> (2)
<223> Asp o Glu

<220>
60 <221> MOD_RES
<222> (3)
<223> Asp o Glu

65 <220>
<221> MOD_RES

ES 2 330 312 T3

<222> (4)
<223> Cys o Pen

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> Cys o Pen

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
<223> Ala o Aib

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (14)
<223> Gly o Ala

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> Cys o Pen

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> Cys o Pen

30 <400> 4

35 **Asn Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa Val Asn Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Leu**
1 5 10 15

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

<220>
<221> DISULFURO
50 <222>(4)..(12)

<220>
<221> DISULFURO
55 <222> (7)..(15)

<220>
<221> MOD_RES
60 <222> (2)
<223> Asp o Glu

<220>
65 <221> MOD_RES
<222> (3)

ES 2 330 312 T3

<223> Asp o Glu

<220>

5 <221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Dpr, Cys, Pen, Asp o Glu

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> Dpr, Cys, Pen, Asp o Glu

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)
<223> Val o Pro

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
<223> Ala o Aib

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (12)
<223> Dpr, Cys, Pen, Asp o Glu

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (14)
<223> Gly o Ala

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> Dpr, Cys, Pen, Asp o Glu

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> Dpr, Cys, Pen, Asp o Glu

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> Dpr, Cys, Pen, Asp o Glu

50 <400> 5
Asn Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa Val Asn Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Leu
1 5 10 15

55 <210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

65 <220>
<221> DISULFURO
<222> (4)..(12)

ES 2 330 312 T3

<220>
<221> DISULFURO
<222> (7)..(15)
5
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
10 <223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (8)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (10)..(11)
<223> Cualquier aminoácido
25
<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(14)
30 <223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
35 <222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 6
40
Xaa Glu Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 7
45 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

<220>
55 <221> DISULFURO
<222> (4)..(12)

60 <220>
<221> DISULFURO
<222> (7)..(15)

65 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)

ES 2 330 312 T3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
5 <223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (5)..(6)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
15 <221> MOD_RES
<222> (8)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (10)..(11)
25 <223> Cualquier aminoácido

<220>
30 <221> MOD_RES
<222> (13)..(14)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
35 <221> MOD_RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

40 <400> 8
Xaa Asp Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

45 <210> 9
<211> 16
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

55 <220>
<221> DISULFURO
<222> (4)..(12)

60 <220>
<221> DISULFURO
<222> (7)..(15)

65 <221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Cualquier aminoácido

ES 2 330 312 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 5 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (8)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(11)
 <223> Cualquier aminoácido

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(14)
 25 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (16)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 9
 35 **Xaa Asp Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa**
 1 5 10 15

<210> 10
 40 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

<220>
 50 <221> DISULFURO
 <222> (4)..(12)

55 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (7)..(15)

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> Cualquier aminoácido

65 <220>
 <221> MOD_RES

ES 2 330 312 T3

<222> (5)..(6)
<223> Cualquier aminoácido

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> Cualquier aminoácido

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(11)
<223> Cualquier aminoácido

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(14)
<223> Cualquier aminoácido

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

30 <400> 10

35 **Xaa Glu Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa**
1 5 10 15

<210> 11
<211> 16
<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

45 <220>
<221> DISULFURO
<222> (4)..(12)

50 <220>
<221> DISULFURO
<222> (7)..(15)

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Cualquier aminoácido

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(6)
<223> Cualquier aminoácido

65 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(6)
<223> Cualquier aminoácido

ES 2 330 312 T3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(14)
5 <223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 14
15
Xaa Glu Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 15
20 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

30 <220>
<221> DISULFURO
<222> (4)..(12)

35 <220>
<221> DISULFURO
<222> (7)..(15)

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Cualquier aminoácido

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(6)
50 <223> Cualquier aminoácido

<220>
55 <221> MOD_RES
<222> (8)
<223> Cualquier aminoácido

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(11)
<223> Cualquier aminoácido

65 <220>
<221> MOD_RES

ES 2 330 312 T3

<222> (13)..(14)
<223> Cualquier aminoácido

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

10 <400> 15
Xaa Asp Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

15 <210> 16
<211> 16
<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

25 <220>
<221> DISULFURO
<222> (4)..(12)

30 <220>
<221> DISULFURO
<222> (7)..(15)

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)

40 <223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(6)

45 <223> Cualquier aminoácido

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)

55 <223> Cualquier aminoácido

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(11)

65 <223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(14)
<223> Cualquier aminoácido

ES 2 330 312 T3

<400> 17

Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10

5 <210> 18
<211> 13
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

15 <220>
<221> DISULFURO
<222> (2)..(10)

20 <220>
<221> DISULFURO
<222> (5)..(13)

25 <220>
<221> MOD_RES
30 <222> (3)..(4)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
35 <221> MOD_RES
<222> (6)
<223> Cualquier aminoácido

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(9)
<223> Cualquier aminoácido

45 <220>
<221> MOD_RES
50 <222> (11)..(12)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 18

Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys
1 5 10

55 <210> 19
60 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético agonista de receptor de guanilato ciclasa

ES 2 330 312 T3

<220>

<221> DISULFURO

<222> (6)..(10)

5

<220>

<221> DISULFURO

<222> (7)..(15)

10

<220>

<221> DISULFURO

<222> (11)..(18)

15

<400> 23

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
1 5 10 15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65