

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 693**

51 Int. Cl.:

A61K 31/135 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2006 E 06813808 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 1937233**

54 Título: **Regulación del equilibrio de fluido intestinal usando calcimiméticos**

30 Prioridad:

02.09.2005 US 713977 P

04.04.2006 US 789036 P

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

11.04.2013

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (33.3%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US;
GEIBEL, JOHN PETER (33.3%) y
HEBERT, PATRICIA R. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GEIBEL, JOHN, PETER;
HEBERT, STEVEN, CHARLES;
MARTIN, DAVID y
RUSSELL, DEBORAH, A.**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 400 693 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

Regulación del equilibrio de fluido intestinal usando calcimiméticos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere generalmente al campo de la medicina y, más específicamente, a medios para tratar o prevenir trastornos del equilibrio de fluido intestinal y modular la secreción y absorción de fluido intestinal.

Antecedentes de la invención

10 Muchos trastornos intestinales resultan directa o indirectamente de desequilibrios en mecanismos finamente regulados de equilibrio de fluidos en el tubo digestivo, que es responsable de la absorción de nutrientes, electrolitos y fluidos, así como de la secreción de desechos, electrolitos en exceso y fluidos. La secreción y absorción discurren en paralelo de modo que se mantiene la homeostasis. Este equilibrio es crítico para prevenir la diarrea y el estreñimiento, así como trastornos de malabsorción y malasimilación.

15 En todo el mundo, la diarrea se cobra 3-5 millones de vidas anualmente, en su mayor parte de lactantes. Un reemplazamiento adecuado de fluidos podría haber prevenido casi todas estas muertes. Aunque su incidencia es mucho más baja en las naciones más prósperas, la diarrea sigue siendo uno de los dos motivos más comunes de consultas en servicios pediátricos de urgencias y es también común entre los ancianos. De manera similar a la diarrea e infecciones entéricas en pacientes con SIDA, la diarrea e infecciones entéricas en niños están asociadas con alteración profunda de la superficie de absorción intestinal, malnutrición y consecuencias a largo plazo, tales como deficiencias a largo plazo en el crecimiento y desarrollo cognitivo en niños pequeños y malabsorción de fármacos antirretrovirales en pacientes con SIDA. La diarrea está entre los problemas de salud más frecuentes a los que se enfrentan los viajeros. Hasta el 40% de los turistas de estancias cortas en países en vías de desarrollo y hasta el 70% de los viajeros de estancias largas experimentarán al menos un episodio de diarrea.

20 Aunque la terapia de rehidratación oral puede reemplazar las pérdidas por diarrea, no facilita la reabsorción del fluido secretado y por tanto no alivia la diarrea. Los antibióticos son de eficacia limitada en muchos tipos de diarrea y no deben usarse para el tratamiento de diarrea de menos de cinco días de duración. Además, muchos antibióticos pueden empeorar la diarrea. Finalmente, no está disponible ninguna vacuna oral eficaz para diarreas infecciosas epidémicas.

25 El estreñimiento es la afección gastrointestinal más común en los Estados Unidos y es particularmente preocupante para los ancianos. A menudo, no se reconoce hasta que el paciente desarrolla trastornos anorrectales o enfermedad diverticular. Aproximadamente el 2% de la población describe episodios intermitentes frecuentes o constantes de estreñimiento. Los tratamientos comunes incluyen laxantes a granel, estimulantes y osmóticos, ablandadores fecales y lubricantes. El uso crónico de laxantes, sin embargo, es totalmente desaconsejable, especialmente laxantes estimulantes.

30 Muchas enfermedades alteran directa o indirectamente la fisiología gastrointestinal de una manera tal que los mecanismos de absorción normales se ven comprometidos, dando como resultado una mala digestión o malabsorción de uno o más constituyentes de la dieta. Normalmente, la malabsorción puede ser la incapacidad para absorber azúcares, grasas, proteínas o vitaminas específicos, o puede ser una malabsorción general del alimento. La diarrea, el meteorismo o los cólicos, el déficit de crecimiento, las deposiciones voluminosas frecuentes, la atrofia muscular progresiva y un abdomen distendido pueden acompañar a la malabsorción. La malabsorción prolongada puede dar como resultado malnutrición y deficiencias de vitaminas. Dos principios básicos subyacen a la gestión de pacientes con malabsorción: (1) la corrección de las deficiencias nutricionales y (2) cuando sea posible, el tratamiento de las enfermedades causantes (por ejemplo, enfermedad celíaca, esprúe tropical, enfermedad de Whipple, insuficiencia pancreática y síndrome del intestino corto). Sin embargo, si el tratamiento de la enfermedad que subyace a la malabsorción fuera problemático debido a, por ejemplo, dificultades en el diagnóstico de la enfermedad, los pacientes con enfermedades de malabsorción se beneficiarían de un tratamiento que aborde la corrección de las deficiencias nutricionales.

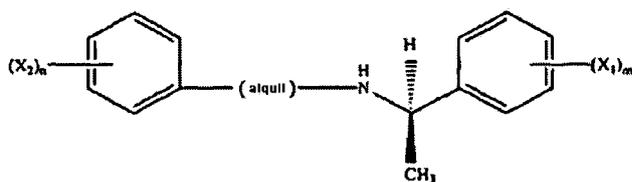
45 El documento WO 95/11221 da a conocer arilalquilaminas activas a nivel del receptor de calcio.

Sumario de la invención

Las realizaciones de la invención son:

50 1. Uso de al menos un compuesto calcimimético para la preparación de una composición farmacéutica para tratar diarrea en un sujeto, en el que

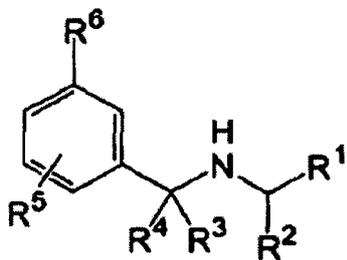
a) el compuesto calcimimético es un compuesto de fórmula I



I

en la que:

- 5 X_1 y X_2 , que pueden ser idénticos o diferentes, son cada uno un radical elegido de radicales CH_3 , CH_3CH_2O , Br, Cl, F, CF_3 , CHF_2 , CH_2F , OH, CH_2OH , $CONH_2$, CN, NO_2 , CH_3CH_2 , propilo, butilo, isobutilo, t-butilo, acetoxilo y acetilo, o dos de X_1 , pueden formar juntos un radical metilendioxi, o dos de X_2 pueden formar juntos un radical metilendioxi; siempre que X_2 no sea un radical 3-t-butilo;
- n oscila entre 0 y 5;
- m oscila entre 1 y 5; y
- 10 el radical alquilo se elige de radicales alquilo C1-C3, que están sustituidos opcionalmente con al menos un grupo elegido de grupos alquilo C1-C9 saturados e insaturados, lineales, ramificados y cíclicos, grupos dihidroindolilo y tiodihidroindolilo y grupos 2-, 3- y 4-piperidinilo;
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- b) el compuesto calcimimético es un compuesto de fórmula II



15

II

en la que:

- R^1 es arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- R^2 es alquilo o haloalquilo;
- 20 R^3 es H, alquilo o haloalquilo;
- R^4 es H, alquilo o haloalquilo;
- cada R^5 presente se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, halógeno, $-C(=O)OH$, $-CN$, $-NR^dS(=O)_mR^d$, $-NR^dC(=O)NR^dR^d$, $-NR^dS(=O)_mNR^dR^d$ o $-NR^dC(=O)R^d$;
- R^6 es arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
- 25 cada R^a es, independientemente, H, alquilo o haloalquilo;
- cada R^b es, independientemente, arilo, aralquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo, cada uno de los cuales puede estar no sustituido o sustituido con hasta 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo, halógeno, haloalquilo, alcoxi, ciano y nitro;
- 30 cada R^c es, independientemente, alquilo, haloalquilo, fenilo o bencilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido o no sustituido;

cada R^d es, independientemente, H, alquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo o heterocicilalquilo en el que el alquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo y heterocicilalquilo están sustituidos con 0, 1, 2, 3 ó 4 sustituyentes seleccionados de alquilo, halógeno, haloalquilo, alcoxilo, ciano, nitro, R^b, -C(=O)R^c, -OR^b, NR^aR^a, NR^aR^b, -C(=O)OR^c, -C(=O)NR^aR^a, -OC(=O)R^c, -NR^aC(=O)R^c, -NR^aS(=O)_nR^c y -S(=O)_nN R^aR^a;

- 5 m es 1 ó 2;
n es 0, 1 ó 2; y
p es 0, 1, 2, 3 ó 4;
siempre que si R² es metilo, p es 0 y R⁶ es fenilo no sustituido, entonces R¹ no es 2,4-dihalofenilo, 2,4-dimetilfenilo, 2,4-dietilfenilo, 2,4,6-trihalofenilo o 2,3,4-trihalofenilo;
- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
c) el compuesto calcimimético es N-(3-[2-clorofenil]-propil)-R- α -metil-3-metoxibencilamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
d) el compuesto calcimimético es N-((6-(metiloxi)-4'-(trifluorometil)-1,1'-bifenil-3-il)metil)-1-feniletanamina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
- 15 e) el compuesto calcimimético es cinacalcet HCl, cinacalcet o metanosulfonato de cinacalcet.
2. Un compuesto calcimimético tal como se expone en la realización 1 para su uso en el tratamiento de diarrea.
3. Uso de al menos un compuesto calcimimético para la preparación de una composición farmacéutica para disminuir la secreción de fluido intestinal en un sujeto.
4. Uso de la realización 3, en el que se aumenta la absorción de fluido.
- 20 5. Uso según la realización 3, en el que el sujeto se prepara para una operación quirúrgica.
6. Uso de al menos un compuesto calcimimético para la preparación de una composición farmacéutica para modular la absorción o secreción de un fármaco o nutriente en el tubo digestivo de un sujeto, en el que se aumenta la absorción de fármaco o nutriente.
7. El uso según la realización 6, en el que el sujeto padece malnutrición o malasimilación.
- 25 8. Uso de al menos un compuesto calcimimético para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una malasimilación o una malnutrición de un sujeto, en el que la malasimilación se debe a trastornos de mezclado, insuficiencia pancreática, concentración intestinal de sales biliares reducida, superficie de absorción inadecuada, defectos de absorción de la mucosa, circulación enterohepática interrumpida de sales biliares u obstrucción linfática.
12. El uso según la realización 8, en el que el sujeto padece malnutrición.
- 30 **Breve descripción de los dibujos**
La figura 1 ilustra mediciones de Jv neto, que está constituido por dos componentes, la absorción basal ^{abs.}Jv y un componente de secreción ^{sec.}Jv.
La figura 2 representa esquemáticamente que el Ca²⁺ luminal o del baño suprime la secreción de fluido inducida por toxina en criptas colónicas de rata perfundidas *in vitro*.
- 35 La figura 3 representa esquemáticamente que el calcimimético compuesto A (estereoisómero R) en el baño suprime la secreción de fluido inducida por toxina en criptas colónicas de rata perfundidas *in vitro*.
La figura 4 representa esquemáticamente que el calcimimético compuesto A (estereoisómero R) en la luz suprime la secreción de fluido inducida por toxina en criptas colónicas de rata perfundidas *in vitro*.
- 40 La figura 5 representa esquemáticamente que el calcimimético compuesto A (estereoisómero S) en el baño suprime la secreción de fluido inducida por toxina en criptas colónicas de rata perfundidas *in vitro*.
La figura 6 representa esquemáticamente que el calcimimético compuesto A (estereoisómero S) en la luz suprime la secreción de fluido inducida por toxina en criptas colónicas de rata perfundidas *in vitro*.
La figura 7 demuestra que la activación de la CaSR por Ca²⁺ extracelular reduce la acumulación de nucleótidos cíclicos estimulada por secretagogo.
- 45 La figura 8 demuestra que la producción de AMP o GMP cíclico inducida por toxina se atenúa por el calcimimético

de una manera dependiente de la dosis.

La figura 9 ilustra que inhibidor de PLC bloquea el efecto del calcimimético sobre la secreción de fluido estimulada por FSK en criptas colónicas de rata.

5 La figura 10 demuestra el efecto del tratamiento con calcimimético sobre la toxicidad de TNF-alfa relacionada con P38 en ratones.

La figura 11 demuestra la ausencia de efectos del Ca^{2+} o del calcimimético compuesto A sobre la secreción de fluido neta estimulada por secretagogo en ratones dobles mutantes para CaSR.

La figura 12 demuestra que en criptas colónicas perfundidas de rata, la adición basolateral de forskolina en presencia de calcio 0,1 mM estimula la entrada de Cl^- basolateral en células de criptas colónicas.

10 La figura 13 demuestra que o bien calcio extracelular o bien compuesto A revierten la inhibición inducida por secretagogo de la absorción de fluido en criptas colónicas de rata.

La figura 14 ilustra que el tratamiento con compuesto B mediaba una reducción estadísticamente significativa de la acumulación de fluido gastrointestinal inducida por toxina del cólera, a dosis de 100 mg/kg por vía oral o 20 mg/kg por vía intravenosa.

15 La figura 15 demuestra que TTX no tiene ningún efecto sobre la magnitud de la secreción de fluido inducida por forskolina o la capacidad del compuesto A para revertir el aumento estimulado por forskolina en la absorción de fluido tanto en el colon proximal como en el distal en el modelo de criptas perfundidas.

20 La figura 16 ilustra que la capacidad del compuesto A para revertir el aumento estimulado por forskolina en la corriente de cortocircuito (I_{cc}) se suprime por TTX en ratas de 6-7 semanas de edad en el modelo de cámara de Ussing.

La figura 17 demuestra que la capacidad del compuesto A para revertir el aumento estimulado por forskolina en la corriente de cortocircuito (I_{cc}) se suprime por TTX ratas de 2-3 semanas de edad en el modelo de cámara de Ussing.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende significar un ser humano, un mamífero acuático o un animal no acuático, que necesita tratamiento. Este sujeto puede tener, o correr el riesgo de desarrollar, por ejemplo, trastornos del equilibrio de fluido intestinal.

30 "Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad incluye: (1) prevenir la enfermedad, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un sujeto que puede estar o haber estado expuesto a la enfermedad o a condiciones que pueden provocar la enfermedad, o predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta o presenta síntomas de la enfermedad, (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o cualquiera de sus síntomas clínicos, o (3) aliviar de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o cualquiera de sus síntomas clínicos.

35 La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad del compuesto de la invención que logrará el objetivo de mejora en la gravedad del trastorno y la frecuencia de incidencia. La mejora en la gravedad del trastorno incluye la reversión de la enfermedad, así como la ralentización de la progresión de la enfermedad.

40 Tal como se usa en el presente documento, "receptor sensible a calcio" o "CaSR" se refiere al receptor acoplado a proteína G que responde a cambios en los niveles de calcio y/o magnesio extracelulares. La activación del CaSR produce aumentos rápidos, transitorios en la concentración de calcio citosólica movilizando calcio de almacenes intracelulares sensibles a tapsigargina y aumentando el flujo de entrada de calcio a través de canales de calcio no regulados por voltaje en la membrana celular (Brown *et al.*, Nature 366: 575-580, 1993; Yamaguchi *et al.*, Adv Pharmacol 47: 209-253, 2000).

La frase "trastornos del equilibrio de fluido intestinal" se refiere a trastornos que se caracterizan por la secreción u absorción de fluido anómala en el tubo digestivo e incluyen, por ejemplo, diarrea y estreñimiento.

45 II. Compuestos calcimiméticos y calcilíticos y composiciones farmacéuticas que los comprenden, administración y dosificación.

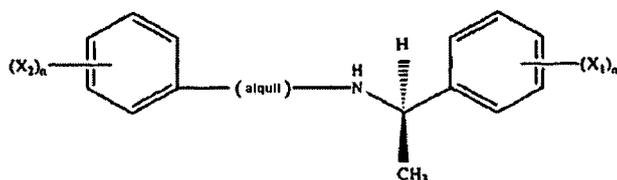
A. Compuestos calcimiméticos, definiciones

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "compuesto calcimimético" o "calcimimético" se refiere a un compuesto que se une a receptores sensibles a calcio e induce un cambio conformacional que reduce el umbral para la activación de receptores sensibles a calcio por el ligando endógeno Ca^{2+} . Estos compuestos calcimiméticos

también pueden considerarse reguladores alostéricos de los receptores de calcio.

En un aspecto, un calcimimético puede tener una o más de las siguientes actividades: provoca un aumento transitorio en el calcio interno, que tiene una duración de menos de 30 segundos (por ejemplo, movilizándolo el calcio interno); provoca un rápido aumento en $[Ca^{2+}]_i$, que se produce en el plazo de treinta segundos; provoca un aumento sostenido (mayor de treinta segundos) en $[Ca^{2+}]_i$ (por ejemplo, provocando un flujo de entrada de calcio externo); provoca un aumento en los niveles de inositol-1,4,5-trifosfato o diacilglicerol, habitualmente en el plazo de menos de 60 segundos; e inhibe la formación de AMP cíclico estimulada por dopamina o isoproterenol. En un aspecto, el aumento transitorio en $[Ca^{2+}]_i$ puede suprimirse mediante tratamiento previo de la célula durante diez minutos con fluoruro de sodio 10 mM o con un inhibidor de fosfolipasa C, o el aumento transitorio se disminuye mediante tratamiento previo breve (no más de 10 minutos) de la célula con un activador de proteína cinasa C, por ejemplo, miristato-acetato de forbol (PMA), mezereína o (-)indolactama V. En un aspecto, un compuesto calcimimético puede ser una molécula pequeña. En otro aspecto, un calcimimético puede ser un anticuerpo agonista frente al CaSR.

El compuesto calcimimético se elige de compuestos de fórmula I y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



I

en la que:

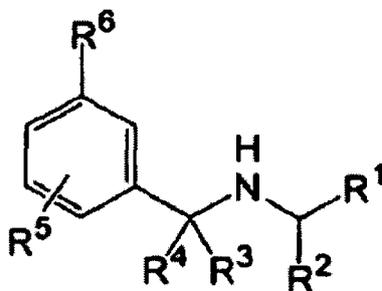
X_1 y X_2 , que pueden ser idénticos o diferentes, son cada uno un radical elegido de radicales CH_3 , CH_3CH_2O , Br, Cl, F, CF_3 , CHF_2 , CH_2F , OH, CH_2OH , $CONH_2$, CN, NO_2 , CH_3CH_2 , propilo, butilo, isobutilo, t-butilo, acetoxilo y acetilo, o dos de X_1 pueden formar juntos un radical metilendioxi, o dos de X_2 pueden formar juntos un radical metilendioxi; siempre que X_2 no sea un radical 3-t-butilo;

n oscila entre 0 y 5;

m oscila entre 1 y 5; y

el radical alquilo se elige de radicales alquilo C1-C3, que están sustituidos opcionalmente con al menos un grupo elegido de grupos alquilo C1-C9 saturados e insaturados, lineales, ramificados y cíclicos, grupos dihidroindolilo y tiodihidroindolilo y grupos 2-, 3- y 4-piperidinilo.

El compuesto calcimimético puede elegirse también de compuestos de fórmula II



II

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

en los que:

R^1 es arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R² es alquilo o haloalquilo;

R³ es H, alquilo o haloalquilo;

R⁴ es H, alquilo o haloalquilo;

5 cada R⁵ presente se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alcoxilo, alcoxilo sustituido, halógeno, -C(=O)OH, -CN, -NR^dS(=O)_mR^d, -NR^dC(=O)NR^dR^d, -NR^dS(=O)_mNR^dR^d o -NR^dC(=O)R^d;

R⁶ es arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

cada R^a es, independientemente, H, alquilo o haloalquilo;

10 cada R^b es, independientemente, arilo, aralquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo, cada uno de los cuales puede estar no sustituido o sustituido con hasta 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo, halógeno, haloalquilo, alcoxilo, ciano y nitro;

cada R^c es, independientemente, alquilo, haloalquilo, fenilo o bencilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido o no sustituido;

15 cada R^d es, independientemente, H, alquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo en el que el alquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo y heterociclilalquilo están sustituidos con 0, 1, 2, 3 ó 4 sustituyentes seleccionados de alquilo, halógeno, haloalquilo, alcoxilo, ciano, nitro, R^b, -C(=O)R^c, -OR^b, NR^aR^a, NR^aR^b, -C(=O)OR^c, -C(=O)NR^aR^a, -OC(=O)R^c, -NR^aC(=O)R^c, -NR^aS(=O)_nR^c y -S(=O)_nNR^aR^a;

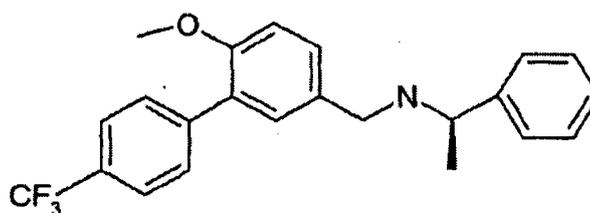
m es 1 ó 2;

n es 0, 1 ó 2; y

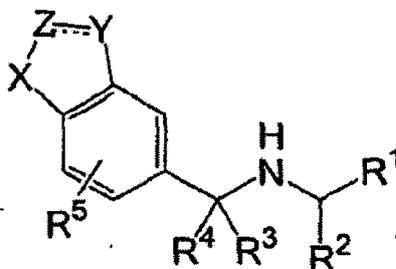
p es 0, 1, 2, 3 ó 4;

20 siempre que si R² es metilo, p es O y R⁶ es fenilo no sustituido, entonces R¹ no es 2,4-dihalofenilo, 2,4-dimetilfenilo, 2,4-dietilfenilo, 2,4,6-trihalofenilo o 2,3,4-trihalofenilo. Estos compuestos se describen en detalle en el documento de solicitud de patente estadounidense publicada número 20040082625, que se incorpora en el presente documento como referencia.

En un aspecto de la invención el compuesto de fórmula II puede tener la fórmula



25 En ciertas realizaciones de la invención el compuesto calcimimético puede elegirse de compuestos de fórmula III



III

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que:

30 ----- representa un enlace sencillo o doble;

R¹ es R^b;

R² es alquilo C₁₋₈ o haloalquilo C₁₋₄;

R³ es H, haloalquilo C₁₋₄ o alquilo C₁₋₈;

R⁴ es H, haloalquilo C₁₋₄ o alquilo C₁₋₄;

5 R⁵ es, independientemente, en cada caso, H, alquilo C₁₋₈, haloalquilo C₁₋₄, halógeno, -O-alquilo C₁₋₆, -NR^aR^d o NR^dC(=O)R^d;

X es -CR^d=N-, -N=CR^d-, O, S o -NR^d-;

cuando ~~*****~~ es un doble enlace entonces Y es =CR⁶- o =N- y Z es -CR⁷= o -N= ; y cuando ~~*****~~ es un enlace sencillo entonces Y es -CR^aR⁶- o -NR^d- y Z es -CR^aR⁷- o -NR^d-; y

10 R⁶ es R^d, haloalquilo C₁₋₄, -C(=O)R^c, -O-alquilo C₁₋₆, -OR^b, -NR^aR^a, -NR^aR^b, -C(=O)OR^c, -C(=O)NR^aR^a, -OC(=O)R^c, -NR^aC(=O)R^c, ciano, nitro, -NR^aS(=O)_mR^c o -S(=O)_mNR^aR^a;

R⁷ es R^d, haloalquilo C₁₋₄, -C(=O)R^c, -O-alquilo C₁₋₆, -OR^b, -NR^aR^a, -NR^aR^b, -C(=O)OR^c, -C(=O)NR^aR^a, -OC(=O)R^c, -NR^aC(=O)R^c, ciano, nitro, -NR^aS(=O)_mR^c o -S(=O)_mNR^aR^a; o

15 R⁶ y R⁷ forman juntos un puente saturado o insaturado de 3 a 6 átomos que contiene 0, 1, 2 ó 3 átomos de N y 0, 1 ó 2 átomos seleccionados de S y O, en el que el puente está sustituido con 0, 1 ó 2 sustituyentes seleccionados de R⁵ en el que cuando R⁶ y R⁷ forman un puente benzo, entonces el puente benzo puede estar sustituido adicionalmente con un puente de 3 ó 4 átomos que contiene 1 ó 2 átomos seleccionados de N y O, en el que el puente está sustituido con 0 ó 1 sustituyentes seleccionados de alquilo C₁₋₄;

R^a es, independientemente, en cada caso, H, haloalquilo C₁₋₄ o alquilo C₁₋₆;

20 R^b es, independientemente, en cada caso, fenilo, bencilo, naftilo o un heterociclo de anillo de 5 ó 6 miembros saturado o insaturado que contiene 1, 2 ó 3 átomos seleccionados de N, O y S, con no más de 2 de los átomos seleccionados de O y S, en el que el fenilo, bencilo o heterociclo están sustituidos con 0, 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados de alquilo C₁₋₆, halógeno, haloalquilo C₁₋₄, -O-alquilo C₁₋₆, ciano y nitro;

R^c es, independientemente, en cada caso, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₄, fenilo o bencilo;

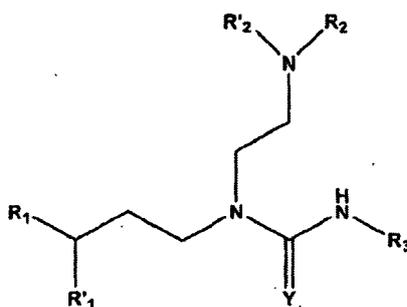
25 R^d es, independientemente, en cada caso, H, alquilo C₁₋₆, fenilo, bencilo o un heterociclo de anillo de 5 ó 6 miembros saturado o insaturado que contiene 1, 2 ó 3 átomos seleccionados de N, O y S, con no más de 2 de los átomos seleccionados de O y S, en el que el alquilo C₁₋₆, fenilo, bencilo, naftilo y heterociclo están sustituidos con 0, 1, 2, 3 ó 4 sustituyentes seleccionados de alquilo C₁₋₆, halógeno, haloalquilo C₁₋₄, -O-alquilo C₁₋₆, ciano y nitro, R^b, -C(=O)R^c, -OR^b, -NR^aR^a, -NR^aR^b, -C(=O)OR^c, -C(=O)NR^aR^a, -OC(=O)R^c, -NR^aC(=O)R^c, -NR^aS(=O)_mR^c y -S(=O)_mNR^aR^a; y

30 m es 1 ó 2.

Los compuestos de fórmula III se describen en detalle en la solicitud de patente estadounidense 20040077619.

En un aspecto, un compuesto calcimimético es N-(3-[2-clorofenil]-propil)-R- α -metil-3-metoxibencilamina HCl (compuesto A). En otro aspecto, un compuesto calcimimético es N-((6-(metiloxi)-4'-(trifluorometil)-1,1'-bifenil-3-il)metil)-1-feniletanamina (compuesto B).

35 En un aspecto, el compuesto calcimimético de la invención puede elegirse de compuestos de fórmula IV

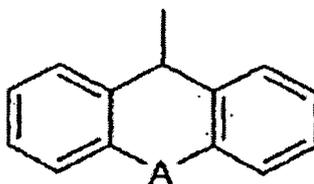


IV

en la que:

Y es oxígeno o azufre;

R₁ y R'₁ son iguales o diferentes, y representan cada uno un grupo arilo, un grupo heteroarilo, o R₁ y R'₁, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman una estructura de anillos condensados de fórmula:



5 en la que A representa un enlace sencillo, un grupo metileno, un grupo dimetileno, oxígeno, nitrógeno o azufre, estando dicho azufre opcionalmente en las formas de sulfóxido o sulfona, en la que cada uno de R₁ y R'₁, o dicha estructura de anillos condensados formada por los mismos, está sustituida opcionalmente con al menos un sustituyente seleccionado del grupo c,

10 en el que el grupo c consiste en: átomos de halógeno, hidroxilo, carboxilo, grupos alquilo, hidroxialquilo, haloalquilo, alquiltio, alqueno y alquinilo lineales y ramificados; grupos alcoxilo lineales y ramificados; grupos tioalquilo lineales y ramificados; hidroxicarbonilalquilo; alquilcarbonilo; alcocarbonilalquilo; alcocarbonilo; trifluorometilo; trifluorometoxilo; -CN; -NO₂; grupos alquilsulfonilo opcionalmente en las formas de sulfóxido o sulfona; en los que cualquier componente de alquilo tiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono, y cualquier componente de alqueno o alquinilo tiene desde 2 hasta 6 átomos de carbono,

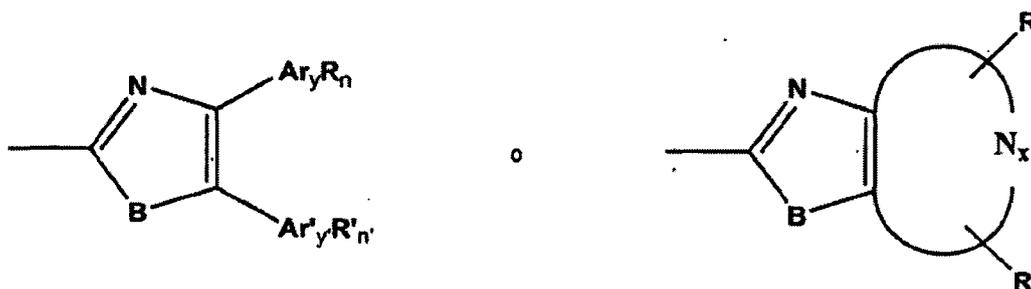
15 y en el que, cuando hay más de un sustituyente, entonces cada dicho sustituyente es igual o diferente,

R₂ y R'₂, que pueden ser iguales o diferentes, representa cada uno: un átomo de hidrógeno; un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono y sustituidos opcionalmente con al menos un átomo de halógeno, grupo hidroxilo o alcoxilo que contiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono; un grupo alquilaminoalquilo o dialquilaminoalquilo en el que cada grupo alquilo contiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono,

20 o R₂ y R'₂, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un heterociclo saturado o insaturado que contiene 0, 1 ó 2 heteroátomos adicionales y que tiene 5, 6 ó 7 átomos de anillo, estando dicho heterociclo sustituido opcionalmente con al menos un sustituyente seleccionado del grupo "c" definido anteriormente,

y en el que, cuando hay más de un sustituyente, dicho sustituyente es igual o diferente,

R₃ representa un grupo de fórmula:



25 en la que B representa un átomo de oxígeno o átomo de azufre, x es 0, 1 ó 2, y e y' son iguales o diferentes, y cada uno es 0 ó 1, Ar y Ar' son iguales o diferentes y cada uno representa un grupo arilo o heteroarilo, n y n' son iguales o diferentes y cada uno es 1, cuando el y o y' con el que está asociado es 0, o es igual al número de posiciones que pueden sustituirse en el Ar o Ar' asociado cuando dicho y o y' es 1, el anillo condensado que contiene N_x es un anillo de heteroarilo de cinco o seis miembros, y en la que R y R', que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno un átomo de hidrógeno o un sustituyente seleccionado del grupo a,

30 en el que el grupo a consiste en: átomos de halógeno; hidroxilo; carboxilo; grupos aldehído; grupos alquilo, alqueno, alquinilo, hidroxialquilo, hidroxialqueno, hidroxialquino, haloalquilo, haloalqueno y haloalquino lineales y ramificados; grupos alcoxilo lineales y ramificados; grupos tioalquilo lineales y ramificados; grupos aralcoxilo; grupos ariloxilo; alcocarbonilo; aralcoxicarbonilo; ariloxicarbonilo; hidroxicarbonilalquilo; alcocarbonilalquilo; aralcoxicarbonilalquilo; ariloxicarbonilalquilo; perfluoroalquilo; perfluoroalcoxilo; -CN; acilo; grupos amino, alquilamino, aralquilamino, arilamino, dialquilamino, diaralquilamino, diarilamino, acilamino y diacilamino; grupos alcocarbonilamino, aralcoxicarbonilamino, ariloxicarbonilamino, alquilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino y

5 arilcarbonilamino; grupos alquilaminocarboniloxilo, aralquilaminocarboniloxilo y arilaminocarboniloxilo; grupos alquilo sustituidos con un grupo amino, alquilamino, aralquilamino, arilamino, dialquilamino, diaralquilamino, diarilamino, acilamino, trifluorometilcarbonilamino, fluoroalquilcarbonilamino o diacilamino; CONH₂; grupos alquil, aralquil y arilamido; alquiltio, ariltio y aralquiltio y las formas de sulfóxido y sulfona oxidadas de los mismos; grupos sulfonilo, alquilsulfonilo, haloalquilsulfonilo, arilsulfonilo y aralquilsulfonilo; sulfonamida, alquilsulfonamida, haloalquilsulfonamida, di(alquilsulfonil)amina, aralquilsulfonamida, di(aralquilsulfonil)amino, arilosulfonamida y di(arilsulfonil)amina; y grupos heterociclilo saturados e insaturados, siendo dichos grupos heterociclilo mono o bicíclicos y estando sustituidos opcionalmente con uno o más sustituyentes, que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados del grupo b,

10 en el que el grupo b consiste en: átomos de halógeno; hidroxilo; carboxilo; grupos aldehído; grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxialquilo, hidroxialquenilo, hidroxialquinilo, haloalquilo, haloalquenilo y haloalquinilo lineales y ramificados; grupos alcoxilo lineales y ramificados; grupos tioalquilo lineales y ramificados; alcoxicarbonilo; hidroxicarbonilalquilo; alcoxicarbonilalquilo; perfluoroalquilo; perfluoroalcoxilo; -CN; acilo; grupos amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino y diacilamino; grupos alquilo sustituidos con un grupo amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino o diacilamino; CONH₂; grupos alquilamido; alquiltio y las formas de sulfóxido y sulfona oxidadas del mismo; grupos sulfonilo, alquilsulfonilo; y grupos sulfonamida, alquilsulfonamida y di(alquilsulfonil)amino,

20 en el que, en los grupos a y b, cualquier componente de alquilo contiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono y cualquier componente de alquenilo o alquinilo contiene desde 2 hasta 6 átomos de carbono, y están sustituidos opcionalmente con al menos un átomo de halógeno o grupo hidroxilo, y en el que cualquier componente de arilo es opcionalmente un grupo heteroarilo.

Los compuestos calcimiméticos útiles en las realizaciones de la invención incluyen los compuestos calcimiméticos descritos anteriormente, así como sus estereoisómeros, enantiómeros, polimorfos, hidratos y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

B. Compuestos calcilíticos, definiciones

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "compuestos calcilíticos" o "calcilíticos" se refiere a compuestos que inhiben, bloquean o disminuyen la actividad del receptor sensible a calcio (CaSR), por ejemplo, provocando una disminución en una o más actividades del receptor de calcio provocadas por Ca²⁺ extracelular. En un aspecto, los calcilíticos pueden bloquear, o bien parcialmente o bien completamente, la capacidad de las concentraciones aumentadas de Ca²⁺ extracelular para (a) aumentar [Ca²⁺]_i; (b) movilizar Ca²⁺ intracelular; (c) 30 aumentar la formación de inositol-1,4,5-trifosfato; y (d) disminuir la formación de AMP cíclico estimulada por dopamina o isoproterenol. En un aspecto, un compuesto calcilítico puede ser una molécula pequeña. En otro aspecto, un calcilítico puede ser un anticuerpo antagonista.

C. Métodos de evaluación de la actividad calcimimética y calcilítica.

35 En un aspecto, pueden identificarse compuestos que se unen al sitio de modulación de la actividad de CaSR usando, por ejemplo, un compuesto marcado que se une al sitio en un formato de ensayo de unión competitiva.

La actividad calcimimética o calcilítica de un compuesto puede determinarse usando técnicas tales como las descritas en las publicaciones internacionales WO 93/04373, WO 94/18959 y WO 95/11211.

Otros métodos que pueden usarse para evaluar la actividad calcimimética o calcilítica de los compuestos se describen a continuación

40 Ensayo de células HEK 293

Se han descrito en detalle previamente células HEK 293 modificadas por ingeniería genética para expresar CaSR paratiroideo humano (HEK 293 4,0-7) (Nemeth EF *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4040-4045). Esta línea celular clonal se ha usado extensamente para seleccionar agonistas, moduladores alostéricos y antagonistas del CaSR (Nemeth EF *et al.* (2001) J. Pharmacol. Exp. Ther. 299:323-331).

45 Para mediciones de la concentración de calcio citoplasmática, se recuperan las células de matraces de cultivo celular mediante tratamiento breve con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,02% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y entonces se lavan y se resuspenden en tampón A (NaCl 126 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, K₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,7 mM, Na-Hepes 20 mM, pH 7,4) complementado con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% y D-glucosa 1 mg/ml. Se cargan las células con fura-2 mediante incubación durante 30 minutos a 37°C en tampón A y éster acetoximetílico fura-2 2 μM. Se lavan las células con tampón B (el tampón B es 50 tampón A que carece de sulfato y fosfato y que contiene KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,5 mM suplementado con BSA al 0,5% y D-glucosa 1 mg/ml) y se resuspenden hasta una densidad de 4 a 5 x 10⁶ células/ml a temperatura ambiente. Para registrar las señales fluorescentes, se diluyen las células cinco veces en tampón B precalentado (37°C) con agitación constante. Las longitudes de onda de excitación y emisión son 340 y 510 nm, respectivamente. 55 La señal fluorescente se registra en tiempo real usando a registrador de banda.

Para el análisis mediante lector de placas de obtención de imágenes fluorométricas (FLIPR), se mantienen las células HEK 293 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal (FBS) al 10% e higromicina 200 µg/ml. 24 h antes del análisis, se tripsinizan las células y se siembran en placa en el medio anterior a $1,2 \times 10^5$ células/pocillo en placas de 96 pocillos, recubiertas con colágeno 1, de fondo transparente, de paredes negras. Se centrifugan las placas a 1.000 rpm durante 2 minutos y se incuban bajo un 5% de CO₂ a 37°C durante la noche. Se cargan entonces las células con éster acetoximetílico fluo-3 6 µM durante 60 minutos a temperatura ambiente. Todos los ensayos se realizan en un tampón que contiene NaCl 126 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, Na-Hepes 20 mM, complementado con D-glucosa 1,0 mg/ml y fracción IV de BSA 1,0 mg/ml (pH 7,4).

En un aspecto, las CE₅₀ para los compuestos activos a nivel del CaSR pueden determinarse en presencia de Ca²⁺ 1 mM. La CE₅₀ para la concentración de calcio citoplasmática puede determinarse comenzando a un nivel de Ca²⁺ extracelular de 0,5 mM. Se realizan experimentos de FLIPR usando un parámetro de láser de 0,8 W y una velocidad de obturador de la cámara CCD de 0,4 segundos. Se exponen las células a calcio, compuesto activo a nivel del CaSR o vehículo (20 µl) y se monitoriza la fluorescencia a intervalos de 1 segundo durante 50 segundos. Entonces, puede hacerse una segunda exposición (50 µl) a calcio, compuesto activo a nivel del CaSR o vehículo y monitorizarse la señal fluorescente. Las señales fluorescentes se miden como la altura del pico de la respuesta dentro del periodo de muestreo. Cada respuesta se normaliza entonces al pico máximo observado en la placa para determinar un porcentaje de fluorescencia máxima.

Células paratiroides bovinas

El efecto de compuestos calcimiméticos o calcilíticos sobre la regulación de la secreción de PTH dependiente de CaSR puede evaluarse usando cultivos primarios de células paratiroides bovinas disociadas. Pueden obtenerse células disociadas mediante digestión con colagenasa, agruparse, resuspenderse entonces en tampón de purificación Percol y purificarse mediante centrifugación a 14.500 x g durante 20 minutos a 4°C. Las células paratiroides disociadas se retiran y se lavan en una mezcla 1:1 de F-12 de Ham y DMEM (F-12/DMEM) complementado con BSA al 0,5%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y gentamicina 20 µg/ml. Se resuspenden finalmente las células en F-12/DMEM que contiene penicilina 10 U/ml, estreptomycin 10 µg/ml y gentamicina 4 µg/ml y se sustituye BSA por ITS+ (insulina, transferrina, ácido selenioso, BSA y ácido linoleico; Colaborative Research, Bedford, MA). Se incuban las células en matraces T-75 a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ en aire.

Tras el cultivo durante la noche, se retiran las células de los matraces por decantación y se lavan con tampón de células paratiroides (NaCl 126 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1 mM, K₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,7 mM, Na-Hepes 20 mM, 20; pH 7,45 y cantidades variables de CaCl₂ tal como se especifique) que contiene BSA al 0,1% y CaCl₂ 0,5 mM. Se resuspenden las células en este mismo tampón y se añaden porciones (0,3 ml) a tubos de poliestireno que contienen controles apropiados, compuesto activo al nivel de CaSR y/o concentraciones variables de CaCl₂. Cada condición experimental se realiza por triplicado. Las incubaciones a 37°C son durante 20 minutos y pueden terminarse colocando los tubos sobre hielo. Se sedimentan las células mediante centrifugación (1500 x g durante 5 minutos a 4°C) y se someten a ensayo inmediatamente 0,1 ml del sobrenadante. Se deja una porción de la células sobre hielo durante el periodo de incubación y entonces se procesa en paralelo con otras muestras. La cantidad de PTH en el sobrenadante de los tubos mantenidos sobre hielo se define como "liberación basal" y se resta de otras muestras. Se mide PTH según las instrucciones del proveedor usando el kit de ensayo inmunoradiométrico de PTH-(1-34) de rata (Immunotopics, San Clemente, CA).

Liberación de calcitonina de células MTC 6-23

Se mantuvieron células MTC 6-23 de rata (clon 6), adquiridas de la ATCC (Manassas, VA) en medio de crecimiento (DMEM con algo contenido en glucosa con calcio/HiHS al 15%) que se reemplazó cada de 3 a 4 días. Se realiza un pase de los cultivos cada semana a una razón de división de 1:4. Se calcula que la concentración de calcio en el medio de crecimiento formulado es de 3,2 mM. Se incuban las células en una atmósfera del 90% de O₂/10% de CO₂, a 37°C. Antes del experimento, se aspiran células de cultivos subconfluentes y se enjuagan una vez con disolución de tripsina. Se aspiran los matraces de nuevo y se incuban a temperatura ambiente con disolución de tripsina nueva durante 5-10 minutos para desprender las células. Se suspenden las células desprendidas a una densidad de $3,0 \times 10^5$ células/ml en el medio de crecimiento y se siembran a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/pocillo (0,5 ml de suspensión de células) en placas de 48 pocillos recubiertas con colágeno (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Se deja que las células se adhieran durante 56 horas tras la siembra, tras lo cual se aspiró el medio de crecimiento y se reemplazó por 0,5 ml de medio de ensayo (DMEM con alto contenido en glucosa sin/FBS al 2%). Se incuban entonces las células durante 16 horas antes de la determinación de la liberación de calcitonina estimulada por calcio. Se calcula que la concentración de calcio real en este medio es inferior a 0,07 mM. Para medir la liberación de calcitonina, se añaden 0,35 ml de agente de prueba en medio de ensayo a cada pocillo y se incuban durante 4 horas antes de la determinación del contenido de calcitonina en el medio. Se cuantifican los niveles de calcitonina según las instrucciones del proveedor usando un kit de ensayo inmunoradiométrico de calcitonina de rata (Immunotopics, San Clemente, CA).

Ensayo de inositol fosfato

También pudieron evaluarse las propiedades calcimiméticas o calcilíticas de los compuestos en un ensayo bioquímico realizado en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un vector de expresión que contiene CaSR clonado de cerebro de rata [CHO(CaSR)] o no [CHO(WT)] (Ruat M. & Snowman AM., J. Biol. Chem 271, 1996, p 5972). Se ha mostrado que CHO (CaSR) estimulan la acumulación de inositol fosfato tritiado ($[^3\text{H}]\text{IP}$) tras la activación del CaSR por Ca^{2+} y otros cationes divalentes y por NPS 568 (Ruat *et al.*, J. Biol. Chem 271, 1996). Por tanto, la acumulación de $[^3\text{H}]\text{IP}$ producida por $10\ \mu\text{M}$ de compuesto activo al nivel de CaSR en presencia de calcio extracelular $2\ \text{mM}$ puede medirse y compararse con el efecto producido por calcio extracelular $10\ \text{mM}$, una concentración que provoca una activación de CaSR máxima (Dauban P. *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 10, 2000, p. 2001).

D. Composiciones farmacéuticas y administración

Pueden usarse compuestos calcimiméticos útiles en la presente invención en forma de sales farmacéuticamente aceptables derivadas de ácidos orgánicos o inorgánicos. Las sales incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, benenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, mandelato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 2-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato, mesilato, y undecanoato. Cuando los compuestos de la invención incluyen una función ácida tal como un grupo carboxilo, entonces los expertos en la técnica conocen bien sales farmacéuticamente aceptables adecuadas para el grupo carboxilo e incluyen, por ejemplo, cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio, amonio cuaternario y similares. Para ejemplos adicionales de "sales farmacológicamente aceptables," véase a continuación y Berge *et al.* J. Pharm. Sci. 66: 1, 1977. En ciertas realizaciones de la invención, pueden usarse sales de clorhidrato y sales de ácido metanosulfónico.

En algunos aspectos de la presente invención, el principio activo a nivel del receptor de calcio puede elegirse de cinacalcet, es decir, N-(1-(R)-(1-naftil)etil)-3-[3-(trifluorometil)fenil]-1-aminopropano, cinacalcet HCl y metanosulfonato de cinacalcet. El compuesto calcimimético, tal como cinacalcet HCl y metanosulfonato de cinacalcet, puede estar en formas diversas tales como polvos amorfos, polvos cristalinos y mezclas de los mismos. Los polvos cristalinos pueden estar en formas que incluyen polimorfos, pseudopolimorfos, hábitos cristalinos, micromeréticos y morfología de partícula.

Para la administración, los compuestos útiles en esta invención se combinan habitualmente con uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Los compuestos pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, goma arábica, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidina y/o poli(alcohol vinílico), y prepararse en comprimidos o encapsularse para su administración convencional. Alternativamente, los compuestos útiles en esta invención pueden disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma tragacanto y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración se conocen bien en la técnica farmacéutica. El portador o diluyente puede incluir material de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar constituidas en una forma sólida (incluyendo gránulos, polvos o supositorios) o en una forma líquida (por ejemplo, disoluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales, tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones etc.

Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas farmacéuticas sólidas, el principio activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte, tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas farmacéuticas también pueden comprender, como en la práctica normal, substancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Pueden prepararse adicionalmente comprimidos y píldoras con recubrimientos entéricos.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral pueden incluir emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua. Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, edulcorantes, aromatizantes y de perfume.

La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo a nivel del receptor de calcio en las composiciones útiles en la invención puede oscilar entre aproximadamente $0,1\ \text{mg}$ y aproximadamente $180\ \text{mg}$, por ejemplo entre

aproximadamente 5 mg y aproximadamente 180 mg, o entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 100 mg del compuesto calcimimético por sujeto. En algunos aspectos, la cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto activo a nivel del receptor de calcio en la composición puede elegirse de desde aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1 mg, 5 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 180 mg.

Aunque puede ser posible administrar un compuesto activo a nivel del receptor de calcio a un sujeto solo, el compuesto administrado estará presente normalmente como principio activo en una composición farmacéutica. Por tanto, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto calcimimético, o una cantidad de dosificación eficaz de al menos un compuesto calcimimético.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad de dosificación eficaz" es una cantidad que proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo a nivel del receptor de calcio cuando se proporciona como una única dosis, en múltiples dosis o como una dosis parcial. Por tanto, una cantidad de dosificación eficaz del compuesto activo a nivel del receptor de calcio de la invención incluye una cantidad inferior, igual o superior a una cantidad eficaz del compuesto; por ejemplo, una composición farmacéutica en la que se requieren dos o más dosificaciones unitarias, tal como en comprimidos, cápsulas y similares, para administrar una cantidad eficaz del compuesto, o alternativamente, una composición farmacéutica de múltiples dosis, tal como polvos, líquidos y similares, en la que se administra una cantidad eficaz del compuesto calcimimético administrando una porción de la composición.

Alternativamente, una composición farmacéutica en la que se requieren dos o más dosificaciones unitarias, tal como en comprimidos, cápsulas y similares, para administrar una cantidad eficaz del compuesto activo a nivel del receptor de calcio puede administrarse en menos de una cantidad eficaz durante uno o más periodos de tiempo (por ejemplo, una administración una vez al día, y una administración dos veces al día), por ejemplo para determinar la dosis eficaz para un sujeto individual, para desensibilizar a un sujeto individual frente a posibles efectos adversos, para permitir un reajuste eficaz de la dosificación o la reducción de otros uno o más agentes terapéuticos administrados a un sujeto individual, y/o similares.

La cantidad de dosificación eficaz de la composición farmacéutica útil en la invención puede oscilar entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 360 mg de una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo aproximadamente 5 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 300 mg o aproximadamente 360 mg de una forma farmacéutica unitaria.

En algunos aspectos de la presente invención, las composiciones dadas a conocer en el presente documento comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activo a nivel del receptor de calcio para el tratamiento o prevención de diarrea. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el compuesto calcimimético tal como cinacalcet HCl puede estar presente en una cantidad que oscila entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 70%, tal como entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 40%, entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 30% o entre aproximadamente el 15% y aproximadamente el 20%, en peso en relación con el peso total de la composición.

Las composiciones útiles en la invención pueden contener uno o más principios activos además del compuesto activo a nivel del receptor sensible a calcio. El principio activo adicional puede ser otro compuesto calcimimético o calcilítico o puede ser un principio activo que tiene una actividad terapéutica diferente. Los ejemplos de tales principios activos adicionales incluyen vitaminas y sus análogos, tales como antibióticos, carbonato de lantano, agentes antiinflamatorios (esteroideos y no esteroideos) e inhibidores de citocina proinflamatoria (ENBREL®), KINERET®). Cuando se administran como una combinación, los agentes terapéuticos pueden formularse como composiciones separadas que se administran al mismo tiempo o a diferentes tiempos, o los agentes terapéuticos pueden administrarse como una única composición.

En un aspecto, las composiciones farmacéuticas útiles para los métodos de la invención pueden incluir compuestos adicionales para ralentizar el tiempo de tránsito a través del tubo digestivo, prolongando de ese modo el tiempo de residencia y promoviendo el contacto de las composiciones de la invención. Se describen ejemplos de tales compuestos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20030013676. En un aspecto, las composiciones pueden incluir GMPc (es decir, 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina cíclica; 3',5'-monofosfato de guanosina; 3',5'-GMP; GMPc; 3',5'-(hidrogenofosfato) de guanosina; 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina; y 3',5'-fosfato cíclico de guanosina).

En otro aspecto, los compuestos usados para poner en práctica los procedimientos de la presente invención pueden formularse para administración oral que libera principios biológicamente activos en el colon sin liberación sustancial en tubo digestivo superior, por ejemplo estómago e intestino. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse con el portador de fármacos que incluye pectina y galactomanano, polisacáridos que son ambos degradables por las enzimas bacterianas del colon (patente estadounidense n.º 6.413.494). Mientras que la

pectina o el galactomanano, si se usan solos como portador de fármacos, se disuelven fácilmente en fluido gástrico simulado y fluido intestinal simulado, una mezcla de estos dos polisacáridos preparada a un pH de aproximadamente 7 o por encima produce un gel fuerte, elástico e insoluble que no se disuelve ni se desintegra en los fluidos gástrico e intestinal simulados, protegiendo así a los fármacos recubiertos con la mezcla de la liberación en el tubo digestivo superior. Cuando la mezcla de pectina y galactomanano llega al colon, se degrada rápidamente por la acción sinérgica de las enzimas bacterianas del colon. Aún en otro aspecto, las composiciones de la invención pueden usarse con la matriz farmacéutica de un complejo de gelatina y un polisacárido aniónico (por ejemplo, pectinato, pectato, alginato, sulfato de condroitina, poli(ácido galactourónico), goma tragacanto, goma arábica y una mezcla de los mismos) que es degradable por las enzimas del colon (patente estadounidense n.º 6.319.518).

10 Tratamiento: Uso médico

En un aspecto, la invención proporciona realizaciones referentes a usos médicos para el tratamiento de trastornos del equilibrio de fluido intestinal en un sujeto. En condiciones fisiológicas normales, aproximadamente 1,5 l de fluido entran en el colon cada día, pero sólo aproximadamente 100-200 ml se excretan en las deposiciones. La regulación del transporte de agua y electrolitos en el colon implica la interacción compleja entre rutas reguladoras humorales, paracrinas y neurales. Los trastornos del equilibrio de fluido intestinal se caracterizan por secreción o absorción anómala de fluido en el tubo digestivo e incluyen, por ejemplo, diarrea y estreñimiento.

A. *Diarrea*

En un aspecto, la invención proporciona medios para tratar trastornos de movilidad intestinal anómala tales como diarrea. Los usos de la invención comprenden realizaciones en las que va a administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto calcimimético.

Tal como se usa en el presente documento, el término "diarrea" se refiere a un estado caracterizado por tres o más deposiciones líquidas en un periodo de 24 horas de volumen superior a 200 g al día. En un aspecto, la diarrea puede ser osmótica, es decir, que resulta si la presión osmótica del contenido intestinal es superior a la del suero. Este estado puede resultar de malabsorción de grasa (por ejemplo, en enfermedad celíaca) o de lactosa (por ejemplo, en deficiencia de lactasa intestinal), o puede suceder debido al uso de ciertos laxantes (por ejemplo, lactulosa, hidróxido de magnesio) o edulcorantes artificiales (por ejemplo, sorbitol, manitol). En otro aspecto, la diarrea puede ser secretora, es decir, se produce cuando hay una secreción de agua neta a la luz. Esto puede producirse con toxinas bacterianas (tales como las producidas, por ejemplo, por *E. coli* y *Vibrio cholerae*), o con hormonas, tales como polipéptido intestinal vasoactivo, que se produce por tumores raros de células de los islotes (cólera pancreático). Tanto la diarrea osmótica como la secretora resultan de anomalías en el intestino delgado de manera que el flujo de agua a través del área ileocecal supera la capacidad de absorción del colon.

En un aspecto adicional, la diarrea puede ser diarrea exudativa, es decir, que resulta del daño directo en la mucosa del intestino delgado o grueso. Este tipo de diarrea puede estar provocada por trastornos infecciosos o inflamatorios del intestino. En un aspecto, la diarrea exudativa puede estar asociada con quimioterapia, radioterapia, inflamación o lesión traumática tóxica. En otro aspecto, la diarrea exudativa puede estar asociada con una operación quirúrgica gastrointestinal o abdominal.

En otro aspecto, la diarrea puede deberse a una aceleración del tránsito intestinal (diarrea por tránsito rápido). Tal estado puede producirse porque el rápido flujo continuo altera la capacidad del intestino para absorber agua.

Tal como se usa en el presente documento, el término "diarrea aguda" se refiere a un estado caracterizado por un peso de las deposiciones de más de 200 g/día con una duración de menos de 14 días, habitualmente asociado con un aumento de la frecuencia de evacuaciones intestinales. Se resumen en la tabla 1 a continuación causas a modo de ejemplo de la diarrea aguda.

Tabla 1
Causas comunes de la diarrea aguda

| | |
|---|---|
| Fármacos | Laxantes, antiácidos, antibióticos, fármacos colinérgicos, lactosa, guanetidina, quinidina, digital, colchicina, complementos de potasio, lactulosa |
| Bacterias (mediada por toxina, citotónica) | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (tanto toxinas sensibles al calor como estables al calor), <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i> |
| Bacterias (mediada por toxina, citotóxica) | <i>Clostridium difficile</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| Bacterias (invasiva) | <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva |

| | |
|--|---|
| Bacterias (mecanismo desconocido) | <i>Escherichia coli</i> enteropatógena, <i>Escherichia coli</i> enteroadherente |
| Virus | Parvovirus (virus de Norwalk), Reovirus (rotavirus), Adenovirus, Calicivirus, Astrovirus, Enterovirus |
| Protozoos | <i>Cryptosporidia</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Ei Tor</i> |
| Parásitos | Strongyloides, Trichuris |

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "diarrea del viajero" se refiere a un síndrome caracterizado por un aumento en la frecuencia de evacuaciones intestinales líquidas, normalmente, cuatro a cinco deposiciones sueltas al día, con síntomas asociados incluyendo cólicos abdominales, náuseas, meteorismo, tenesmo rectal, fiebre y malestar. La diarrea del viajero puede caracterizarse por un comienzo abrupto, durante el viaje o poco después de regresar a casa. En un aspecto, puede estar provocada por *E. coli* enterotoxigénica. En otro aspecto, puede estar provocada por gastroenteritis por *Salmonella*, disentería por *Shigella* o patógenos virales entéricos.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "diarrea crónica" se refiere a un estado caracterizado por un peso de las deposiciones de más de 200 g/día con una duración de más de 14 días, asociado habitualmente con un aumento de la frecuencia de evacuaciones intestinales. Se resumen en la tabla 2 a continuación mecanismos fisiopatológicos de la diarrea crónica.

Tabla 2
Mecanismos fisiopatológicos de la diarrea crónica

| Alteración principal | Causas / mecanismos probables | Ejemplos / estados asociados |
|---|---|--|
| Osmótica | Ingestión | Antiácidos, laxantes |
| | Mala digestión | Insuficiencia pancreática, deficiencia de disacaridasa |
| | Malabsorción | Malabsorción de hidratos de carbono, cloridiorrea congénita |
| Trastornos del tránsito intestinal | Tránsito lento ("síndrome del asa ciega") tiempo de contacto excesivo | Fístulas, estenosis (tal como en el paciente con enfermedad de Crohn), neuropatía diabética |
| | Tránsito rápido – tiempo de contacto insuficiente | Resección intestinal, hipertiroidismo, colon irritable |
| Secretora | Endotoxinas bacterianas | <i>Vibrio cholerae</i> , <i>E. coli</i> enterotoxigénica |
| | Secretagogos | Ácidos biliares, ácidos grasos, etanol, prostaglandinas, fenoltaleína, dioctilsulfocinato de sodio, VIP, gastrina, calcitonina |
| Exudativa | Aumento del paso de fluidos corporales a la luz | Colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn |

15 En un aspecto, la diarrea puede estar mediada por AMP cíclico. En otro aspecto, la diarrea puede estar asociada con o resultar de una elevación en GMP cíclico. En un aspecto adicional, la diarrea puede estar provocada por un medicamento antiinflamatorio, cafeína, esteroides, fármacos o laxantes. En otro aspecto, la diarrea puede estar provocada por el síndrome del intestino corto.

20 En un aspecto, la invención proporciona realizaciones para tratar trastornos de secreción / absorción anómala de fluido gástrico conjuntamente con el tratamiento de las causas subyacentes de, por ejemplo, la diarrea o con otros métodos de tratamiento. En un aspecto, pueden administrarse calcimiméticos a un sujeto antes de, después de o simultáneamente con la terapia de rehidratación oral. Por ejemplo, la terapia de rehidratación oral puede contener los siguientes componentes: sodio, potasio, cloruro, bicarbonato, citrato y glucosa. En otro aspecto, pueden administrarse calcimiméticos a un sujeto antes de, después de o simultáneamente con un agente antimotilidad, tal como loperamida (Imodium), difenoxilato o subsalicilato de bismuto (Pepto-Bismol). En otro aspecto, pueden administrarse calcimiméticos con antibióticos (por ejemplo, trimetoprim-sulfametoxazol (Bactrim DS), ciprofloxacino (Cipro), norfloxacino (Noroxin), ofloxacino (Floxin), doxiciclina (Vibramycin), eritromicina). En un aspecto, puede

administrarse un compuesto calcimimético junto con calcio o poliaminas tales como metabolitos de espermina, espermidina, putrescina y ornitina o aminoácidos tales como L-triptófano, L-fenilalanina. En otro aspecto, puede administrarse un compuesto calcimimético junto con sodio y glucosa.

Además, pueden administrarse calcimiméticos conjuntamente con tratamientos quirúrgicos y no quirúrgicos.

5 **C. Métodos de modulación de la secreción y absorción de fluido intestinal**

La invención proporciona además realizaciones para regular la secreción y absorción de fluido intestinal. En un aspecto, el fin puede ser aumentar la absorción de fluido y/o disminuir la secreción de fluido en un sujeto y, por tanto, las realizaciones de la invención pueden comprender que se administre una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto calcimimético.

10 En otro aspecto, el fin puede ser aumentar la secreción de fluido intestinal o reducir la absorción de fluido intestinal, y por tanto el método de la invención puede comprender administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto calcilítico. En un aspecto, la realización puede usarse conjuntamente con la preparación de un individuo para una operación quirúrgica, por ejemplo, para una cirugía abdominal o una colonoscopia. Además, el método puede usarse para preparar el intestino para un examen radiográfico.

15 **D. Malabsorción y malasimilación**

La invención proporciona realizaciones de modulación de la absorción o secreción de un fármaco, veneno o nutriente en el tubo digestivo de un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto calcimimético o calcilítico junto con un portador farmacéuticamente aceptable al sujeto.

20 En un aspecto, la absorción del fármaco o nutriente aumenta y el compuesto administrado es un calcimimético. En un aspecto, la invención proporciona métodos de tratamiento de una malasimilación o una malabsorción de un sujeto, que comprenden administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un calcimimético junto con un portador farmacéuticamente aceptable al sujeto.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "malasimilación" abarca procesos alterados de absorción y digestiones de alimento que se producen de una de dos maneras (1) por trastornos intraluminales (mala digestión del alimento) y (2) por trastornos intraparietales (malabsorción de alimento). Se resumen en la tabla 4 manifestaciones clínicas de la malasimilación.

Tabla 4

Clasificación de síndromes de malasimilación

| Digestión intraluminal defectuosa | Absorción intraparietal defectuosa |
|---|---|
| <u>Trastornos de mezclado</u> Postgastrectomía | <u>Superficie de absorción inadecuada</u> Derivación o resección intestinal Enfermedad vascular mesentérica con resección intestinal masiva |
| <u>Insuficiencia pancreática</u> Primaria (fibrosis quística) Secundaria (pancreatitis crónica) Carcinoma pancreático Resección pancreática) | Enteritis regional con resecciones múltiples del intestino Derivación yeyunoileal |
| <u>Concentración intestinal de sales biliares reducida</u> | <u>Defectos de absorción de la mucosa</u> <u>Anomalías bioquímicas o genéticas</u> Enfermedad celíaca Deficiencia de disacaridasa Hipogammaglobulinemia Abetalipoproteinemia Enfermedad de Hartnup Cistinuria Malabsorción de monosacáridos |
| <u>Enfermedad hepática</u> Enfermedad hepatocelular Colestasis (intrahepática o extrahepática) | <u>Trastornos inflamatorios o infiltrativos</u> Enteritis regional Amiloidosis Esclerodermia Linfoma Enteritis por radiación Enteritis eosinofílica Esprúe tropical |
| <u>Proliferación bacteriana anómala en el intestino delgado</u> Estasis de asa aferente Estenosis Fístulas Asas ciegas Divertículos múltiples del intestino delgado Estados de hipomotilidad (diabetes, esclerodermia, pseudobstrucción intestinal) | |
| <u>Circulación enterohepática interrumpida de sales</u> | |

| | |
|--|---|
| <p><i>biliares</i> Resección del íleo Enfermedad inflamatoria del íleo (ileítis regional)</p> <p><i>Fármacos</i> (por secuestro o precipitación de sales biliares) Neomicina Carbonato de calcio Colestiramina</p> | <p>Enteritis infecciosa (por ejemplo, salmonelosis) Esprúe colágeno Yeyunitis ulcerosa no específica Mastocitosis Trastornos dermatológicos (por ejemplo, dermatitis herpetiforme)</p> <p><i>Obstrucción linfática</i> Linfangiectasia intestinal Enfermedad de Whipple Linfoma</p> |
|--|---|

En un aspecto, la invención proporciona realizaciones para el tratamiento de la malasimilación de un sujeto, que comprende el uso de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto calcimimético junto con un portador farmacéuticamente aceptable que va a administrarse a un sujeto. En un aspecto pueden ponerse en práctica realizaciones de la invención en combinación con las realizaciones de tratamiento de las causas subyacentes de la malasimilación. Por ejemplo, pueden ponerse en práctica métodos de la invención conjuntamente con restricciones dietéticas (por ejemplo, en casos de intolerancia a hidratos de carbono o grasas). En otro aspecto, puede administrarse un calcimimético en combinación con antibióticos (por ejemplo, gentamicina), agentes de unión a ácidos biliares (por ejemplo, colestiramina) o enzimas digestivas (por ejemplo, pancrelipasa).

Pueden ponerse en práctica también realizaciones de la invención que comprenden el uso de una composición farmacéutica que comprende un calcimimético que va a administrarse para tratar la malnutrición en un sujeto. Por ejemplo, un sujeto puede estar malnutrido si el sujeto tiene un peso extremadamente bajo (el peso con respecto a la altura está por debajo del 80% de lo normal), un sobrepeso grande (el peso con respecto a la altura está por encima del 120% de lo normal), si el sujeto pierde de forma no intencionada un 10% o más de peso corporal, se somete a una operación quirúrgica del tubo digestivo, experimenta pérdidas de nutrientes (por ejemplo, por diarrea, diálisis, vómitos), tiene necesidades metabólicas aumentadas (por ejemplo, debido al embarazo, lactación, actividad física aumentada, fiebre, lesión), es un alcohólico o usuario crónico de fármacos (antibióticos, antidepresivos, diuréticos), tiene enfermedades que interfieren con la ingesta, absorción, metabolismo o utilización de nutrientes, tiene una mala dentición (particularmente en los sujetos ancianos) o tiene úlceras bucales debido a herpes, VIH o quimioterapia. En otro aspecto, el sujeto puede estar malnutrido debido a factores de riesgo dietéticos (por ejemplo, pérdida de apetito, ingesta inadecuada de alimentos o nutrientes, falta de variedad de alimentos, dietas para perder peso o de moda, fibra inadecuada, grasa excesiva, sodio, azúcar, alcohol en exceso, come demasiado pocas frutas, verduras) o debido a factores de riesgo social (por ejemplo, mala salud crónica, pobreza, falta de dinero para comprar alimentos, bajo status socioeconómico, inmovilidad o incapacidad para comprar, almacenar o cocinar alimentos, aislamiento social, come solo/a la mayor parte del tiempo, es drogodependiente, estados que limitan la capacidad del sujeto para comer). Además, pueden ponerse en práctica las realizaciones de la invención cuando un sujeto tiene acceso limitado a nutrientes, tal como durante la supervivencia tras desastres medioambientales, supervivencia en el mar, naufragio y estancias en las profundidades del mar o viajes espaciales.

Pueden ponerse en práctica las realizaciones de la invención que comprenden el uso de una composición farmacéutica que comprende un compuesto calcilítico que va administrarse, por ejemplo, para reducir la absorción intestinal de un fármaco, compuesto químico o nutriente en un sujeto. En un aspecto, el sujeto puede tener sobrepeso. En otro aspecto, el sujeto puede estar en riesgo debido a la ingestión de un veneno o fármaco.

Ejemplo 1

Este ejemplo explica resumidamente métodos para aislamiento de criptas y perfusiones, métodos para evaluar la absorción y secreción de fluido en una variedad de especies y métodos para evaluar propiedades calcimiméticas y calcilíticas de compuestos. Puede evaluarse el efecto de compuestos calcimiméticos o calcilíticos sobre la regulación dependiente de CaSR del movimiento de fluido neto (J_v), cambios en la acumulación de IP3 y calcio intracelular usando criptas del colon recién aisladas o colonocitos dispersados.

Métodos para perfusión y aislamiento de criptas in vitro

En todos los experimentos se usaron ratas Sprague-Dawley macho no sometidas a ayuno que pesaban entre 150-200 g o ratones que pesaban 20-30 g. Puede seguirse el mismo protocolo tanto para ratas como para ratones. Tras el sacrificio, se obtienen criptas individuales del colon distal mediante disección manual. Se determina el movimiento de fluido neto (J_v) usando los métodos de microperfusión anteriormente descritos en detalle para criptas del colon, túbulos renales y glándulas gástricas (Geibel, J. *et al.* 1989 *Am. J. Physiol* 257:F790-F797; Boron, W.F. *et al.* 1994. *J. Exp. Biol.* 196:347-360). En resumen, se colocan criptas individuales disecadas manualmente en una cámara de temperatura controlada en una platina de un microscopio invertido. Se usa un montaje de micropipetas de vidrio concéntricas para sujetar el extremo ciego de la cripta. Se usa la pipeta de perfusión para perforar este extremo ciego e introducir el perfundido que contiene metoxi-³H-inulina en la luz de la cripta en una dirección anterógrada. Se

5 usa un segundo conjunto de micropipetas para canular el extremo abierto de la cripta y recoger el efluente. Tras la canulación las disoluciones de luz y de baño fluyen de manera continua a 4-10 nl/min. y 5 ml/min., respectivamente. Se toman muestras del efluente con una pipeta de volumen calibrado. Se determina el Jv a partir de la longitud y el diámetro de la cripta, la tasa a la que se acumula el efluente en la pipeta de recogida y a partir de la concentración de metoxi-³H-inulina en el perfundido y el efluente. Se determinó la [metoxi-³H-inulina] en un contador de centelleo. También se recogió el baño (fluído en el lado de la sangre de la cripta colónica, es decir, no en la luz) para detectar fugas o bien de la pipeta de perfusión o bien de la cripta. Se descartan los experimentos siempre que la [metoxi-³H-inulina] en el baño superó el fondo. El Jv se expresa como nl/mm·min. Cada punto de datos representa el promedio de tres recogidas de efluente de cinco minutos. Los valores positivos representan absorción neta, mientras que los valores negativos representan secreción neta.

Se estudian al menos cinco criptas en cada protocolo experimental. Al final de cada experimento se evalúa la viabilidad de la cripta con azul de tripano y se descartaron los experimentos en los que las células no lograron excluir el colorante; se descartan menos del 15% de las criptas.

Colonocitos o criptas colónicas recién aisladas de rata, ratón o ser humano

15 Se extraen colonias de ratas o ratones o muestras quirúrgicas obtenidas de seres humanos, se abren mediante corte longitudinal, se lavan y después se everten para exponer la superficie mucosa. Para obtener células de superficie, o bien se raspan suavemente los colonos evertidos sobre la mucosa con un portaobjetos de vidrio o bien se incuban durante 15 min. a 37°C en tampón de citrato de Na que contiene (mM) NaCl 96, citrato de Na 27, KH₂PO₄ 0,8 Na₂HPO₄ 5,6 y D-glucosa 1,5, pH 7,4. Para obtener criptas aisladas, se incuban segmentos colónicos durante 15 min. a 37°C en tampón de Na-EDTA que contiene (mM) NaCl 96, KCl 1,5, Na-EDTA 21, sorbitol 55, sacarosa 22 y HEPES 10, pH 7,4 (método 3). Al final de cada incubación, se agitan vigorosamente los segmentos colónicos durante 30 s para liberar células de superficie o criptas individuales. Se mezclan inmediatamente las células de criptas liberadas con 2 volúmenes de disolución de Ringer convencional que contiene (mM) NaCl 125, KCl 5,0 CaCl₂ 1,0, MgSO₂ 1,2, NaH₂PO₄ 2,0, D-glucosa 5,0 y HEPES 32, pH 7,4. Se recogen las células mediante centrifugación (2000 rpm durante 5 min. en una centrifugadora Alegria 6R de Beckman Coulter), se lavan tres veces en disolución de Ringer basal y se resuspenden en disolución de Ringer basal. La disolución de Ringer basa contiene la misma composición que la de Ringer convencional excepto porque tanto Ca²⁺ como Mg²⁺ se reducen hasta 0,1-0,5 mM.

30 Para el aislamiento de diferentes fracciones o zonas de células de criptas, se emplea una digestión secuencial de segmentos colónicos en el tampón de Na-EDTA. Tras una incubación de 15 min. en el tampón de citrato de Na y retirada de las células de superficie, se transfieren los colonos al tampón de Na-EDTA y se incuban a 37°C durante 5 min. Entonces se agitan segmentos colónicos y se retiran del tampón, y se centrifuga el tampón para proporcionar un sedimento que consiste en el tercio exterior de las criptas. La incubación continua de segmentos colónicos con tampón de Na-EDTA (5 min., 37°C) seguida por agitación vigorosa libera el tercio central de las criptas. Una incubación de 3-5 min. adicional con agitación liberó el tercio interior de las criptas. Se diluyen las células liberadas en 2 volúmenes de disolución de Ringer convencional helada y se recogen mediante centrifugación. La separación secuencial de células de superficie y las tres zonas de células de criptas pueden validarse midiendo la actividad de fosfatasa alcalina (medida en un espectrofotómetro DU® 640B (Beckman Coulter) según las instrucciones de fabricante (Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO) usando fosfato de p-nitrofenilo como sustrato. Los resultados se expresan como el aumento de la absorbancia por minuto por mg de proteína a una longitud de onda de 405 nm).

Mediciones de fluido neto (Jv)

El método usado para mediciones de movimiento de fluido neto (Jv, nl/min*mm de longitud de cripta) en la cripta colónica sometida a perfusión aislada se ha publicado en detalle en Geibel, J. P. *et al.* 2001. *Gastroenterology* 120: 144-150. Jv se calcula como la tasa a la que se acumuló el efluente en la pipeta de recogida y las concentraciones de metoxi-³H]inulina en el perfundido y el efluente. Los valores de Jv positivos indican un movimiento de fluido neto desde la luz hacia el baño (absorción), y los valores negativos indican un movimiento de fluido neto desde el baño hacia la luz (secreción). La figura 1 demuestra la medición de Jv neto (nl/min*mm de longitud de cripta), que está constituida por dos componentes: un gran flujo de fluido desde la luz hacia el baño (el ^{abs}Jv basal de absorción) y un pequeño flujo desde el baño hacia la luz de componente de secreción (en ausencia de secretagogos; ^{sec}Jv basal). La adición de bumetanida basolateral suprime el ^{sec}Jv y un flujo de absorción "puro" es igual a ^{net}Jv = ^{abs}Jv + ^{sec}Jv; ^{abs}Jv es un flujo positivo y ^{sec}Jv es un flujo negativo.

El método descrito anteriormente puede usarse para material de ratones, ratas y humano.

Medición de respuestas de Ca²⁺ intracelular en colonocitos

55 También pueden evaluarse las propiedades calcimiméticas o calcilíticas de compuestos usando mediciones de cambios de Ca²⁺ intracelular de suspensiones de células colónicas aisladas usando Fluo-3 o Fura-2. Se exponen las células a una disolución de o bien Fluo-3 AM o bien Fura-2 AM a 5 μM durante de 20 a 30 min. a temperatura ambiente para permitir la captación y la hidrólisis de éster. Entonces se lavan las células a 37°C durante aproximadamente 20 min. para eliminar cualquier colorante extracelular que no se haya catado o se haya

desesterificado sobre la superficie extracelular de las criptas. Se realizan mediciones de fluorescencia (Fluo-3: excitación a 480 nm, emisión a 520 nm, paso de banda de 5 nm; Fura-2: excitación a 340/380 nm, emisión a 512 nm, paso de banda de 5 nm) con suspensiones de células en una cubeta de 2 ml termostáticamente regulada mantenida a 37°C con agitación constante en disolución de Ringer basal que contiene Ca^{2+} 0,1 mM. Se determina la respuesta de Ca^{2+} acumulativa a una concentración dada del calcimimético o calcilítico.

Medición de corriente en cortocircuito en láminas intestinales

También pueden evaluarse las propiedades calcimiméticas o calcilíticas de compuestos usando mediciones de corriente en cortocircuito en láminas intestinales. Se extraen rápidamente segmentos de colon o intestino delgado de ratas o ratones, o de muestras quirúrgicas humanas. Se cortan los segmentos a lo largo del borde mesentérico para obtener una lámina plana y se lavan con disolución de Ringer con HEPES basal helada que contiene Ca y Mg 0,1 mM. Se usa o bien la capa de intestino delgado completa o bien una capa colónica mucosa que tiene las capas serosa, muscular longitudinal y circular y submucosa separadas. Se monta la lámina intestinal entre dos mitades de una cámara de Ussing modificada y se ponen en cortocircuito mediante una pinza de tensión (VCC MC6; Physiologic Instruments) con corrección para la resistencia de la disolución. El área de exposición es de 0,3-1,0 cm². Se bañan las superficies mucosa y serosa del tejido en depósitos con 3-5 ml de disolución de Ringer con HEPES, pH 7,4, mantenida a 37°C y se burbujan continuamente con O₂ al 100%. Se deja a los tejidos un mínimo de 40 minutos de estabilización y periodo de registro basal antes de añadir compuestos al lado apical o basolateral del epitelio. Se registraron respuestas de manera continua y se adquirieron datos mediante instrumentos DATAQ™ y se almacenaron en un PC y se procesaron usando el programa Acqualize™. La disolución de Ringer con HEPES contiene (en mmol/l): NaCl 125; KCl 5; MgCl₂ 0,5; HEPES 22, CaCl₂ 0,1 ó 1,6; glucosa 10, pH 7,4. Se burbujea la disolución con O₂ al 100%. Tras lograr una corriente de cortocircuito negativa estimulada por forskolina o basal estable, se monitorizan las respuestas de la corriente frente a adiciones de compuestos en el lado seroso o mucoso.

Liberación de calcitonina por células MTC 6-23

Se mantuvieron células MTC 6-23 de rata (clon 6), adquiridas de la ATCC (Manassas, VA) en medio de crecimiento (DMEM con algo contenido en glucosa con calcio/HIHS al 15%) que se reemplazó cada de 3 a 4 días. Se realiza un pase de los cultivos cada semana a una razón de división de 1:4. Se calcula que la concentración de calcio en el medio de crecimiento formulado es de 3,2 mM. Se incuban las células en una atmósfera del 90% de O₂/10% de CO₂, a 37°C. Antes del experimento, se aspiran células de cultivos subconfluentes y se enjuagan una vez con disolución de tripsina. Se aspiran los matraces de nuevo y se incuban a temperatura ambiente con disolución de tripsina nueva durante 5-10 minutos para desprender las células. Se suspenden las células desprendidas a una densidad de 3,0 x 10⁵ células/ml en el medio de crecimiento y se siembran a una densidad de 1,5 x 10⁵ células/pocillo (0,5 ml de suspensión de células) en placas de 48 pocillos recubiertas con colágeno (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). Se deja que las células se adhieran durante 56 horas tras la siembra, tras lo cual se aspiró el medio de crecimiento y se reemplazó por 0,5 ml de medio de ensayo (DMEM con alto contenido en glucosa sin/FBS al 2%). Se incuban entonces las células durante 16 horas antes de la determinación de la liberación de calcitonina estimulada por calcio. Se calcula que la concentración de calcio real en este medio es inferior a 0,07 mM. Para medir la liberación de calcitonina, se añaden 0,35 ml de agente de prueba en medio de ensayo a cada pocillo y se incuban durante 4 horas antes de la determinación del contenido de calcitonina en el medio. Se cuantifican los niveles de calcitonina según las instrucciones del proveedor usando un kit de ensayo inmunoradiométrico de calcitonina de rata (Immutopics, San Clemente, CA).

Ensayo de inositol fosfato

También pudieron evaluarse las propiedades calcimiméticas o calcilíticas de los compuestos en un ensayo bioquímico realizado en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un vector de expresión que contiene CaSR clonado de cerebro de rata [CHO(CaSR)] o no [CHO(WT)] (Ruat M. & Snowman AM., J. Biol. Chem 271, 1996, p 5972). Se ha mostrado que CHO (CaSR) estimula la acumulación de inositol fosfato tritiado ([³H]IP) tras la activación del CaSR por Ca^{2+} y otros cationes divalentes y por compuesto A (N-(3-[2-clorofenil]-propil)-R- \blacksquare -metil-3-metoxibencilamina HCl) (Ruat *et al.*, J. Biol. Chem 271, 1996). Por tanto, la acumulación de [³H]IP producida por 10 μM de cada compuesto activo a nivel de CaSR en presencia de calcio extracelular 2 mM puede medirse y compararse con el efecto producido por calcio extracelular 10 mM, una concentración que provoca una activación de CaSR máxima (Dauban P. *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 10, 2000, p. 2001). Este ensayo también puede usarse para evaluar la acumulación de [³H]IP₃ en respuesta a compuestos calcimiméticos o calcilíticos en criptas colónicas aisladas o colonocitos dispersos (Cheng *et al.*, Gastroenterology 126, 2004, p. 148).

Disoluciones y productos químicos

La disolución de HEPES-Ringer contenía (en mmol/l): NaCl 125; KCl 5; MgCl₂ 0,5; HEPES 22, CaCl₂ 0,1 ó 1,6; glucosa 10, pH 7,4. Se burbujeó la disolución con un 100% de O₂. Se obtuvieron forskolina, IBMX y bumetanida de Sigma Chemical (St Louis, MO, EE.UU.) y se prepararon disoluciones madre en dimetilsulfóxido (DMSO). Las concentraciones finales de DMSO no excedieron nunca del 0,1% (v/v). Experimentos preliminares indicaron que el vehículo no alteraba ningún parámetro electrofisiológico inicial.

Se formularon CTX, STA y guanilina en tampón HEPES-Ringer a las concentraciones deseadas tal como se muestra en la figura 2.

Ejemplo 2

5 Este experimento demuestra el efecto de calcimiméticos sobre la secreción de fluido. Para evaluar la relevancia funcional del CaSR en las células epiteliales de colon, particularmente su capacidad para modular el movimiento del fluido intestinal en estados diarreicos, se determinó el efecto de la activación y modulación de CaSR luminal o basolateral sobre Jv en criptas colónicas de rata aisladas tanto en estado basal como con agentes que afectan a los niveles de AMPc y GMPc.

10 Las figuras 2A y 2B resumen los cambios en Jv en criptas colónicas perfundidas en ausencia y presencia de agentes que inducen la producción de AMPc (por ejemplo, forskolina, toxina del cólera), antes y después de elevar el calcio extracelular desde 0,1 mM hasta 2 mM en el baño o perfundido luminal. En ausencia de forskolina o toxina del cólera, los valores de Jv medios indican absorción de fluido neta (A y B, barras blancas). La exposición a forskolina o toxina del cólera a Ca 0,1 mM indujo secreción de fluido neta (A y B, barras negras). La elevación del Ca²⁺ desde 0,1 mM hasta 2 mM en o bien el baño o bien el perfundido de la luz revertió la secreción de fluido neta inducida por forskolina o toxina del cólera, dando como resultado absorción de fluido neta (A y B, barras negras).

15 Las figuras 2C y 2D resumen los cambios en Jv en criptas colónicas perfundidas en ausencia y presencia de agentes que inducen la producción de GMPc (por ejemplo, guanilina, STa), antes y después de la elevación del calcio extracelular desde 0,1 mM hasta 2 mM en el baño o perfundido luminal. En ausencia de guanilina o STa, los valores de Jv medios indican absorción de fluido neta (C y D, barras blancas). La exposición a guanilina o STa a Ca 0,1 mM indujo secreción de fluido neta (A y B, barras negras). La elevación del Ca²⁺ desde 0,1 mM hasta 2 mM en o bien el baño o bien el perfundido de la luz revertió la secreción de fluido neta inducida por guanilina o STa, dando como resultado absorción de fluido neta (C y D, barras negras).

20 La figura 3 (A-G) ilustra que el compuesto A atenúa de manera dependiente de la dosis la secreción de fluido neta inducida por forskolina en presencia de Ca²⁺ 0,1 mM en el baño. Las barras negras (paneles A-G) indican la absorción de fluido neta en ausencia de forskolina y compuesto A. Las barras blancas indican la secreción de fluido neta en presencia de forskolina (10 μM). Las barras sombreadas (paneles A-G) indican que el compuesto A atenúa de una manera dependiente de la dosis la secreción de fluido neta en el baño con la CE₅₀ de 5,1 pM (figura 3, panel H).

25 La figura 4 (A-G) ilustra que R568 atenúa de manera dependiente de la dosis la secreción de fluido neta inducida por forskolina en presencia de Ca²⁺ 0,1 mM en la luz. Las barras negras (paneles A-G) indican la absorción de fluido neta en ausencia de forskolina y compuesto A, estereoisómero R. Las barras blancas indican la secreción de fluido neta en presencia de forskolina (10 μM). Las barras sombreadas (paneles A-G) indican que el compuesto A atenúa de manera dependiente de la dosis la secreción de fluido neta luminal con la CE₅₀ de 23,4 pM (figura 4, panel H).

30 La figura 5 (A-G) ilustra que S568 atenúa de manera dependiente de la dosis la secreción de fluido neta inducida por forskolina en presencia de Ca²⁺ 0,1 mM en el baño. Las barras negras (paneles A-G) indican la absorción de fluido neta en ausencia de forskolina y compuesto A, estereoisómero S. Las barras blancas indican la secreción de fluido neta en presencia de forskolina (10 μM). Las barras sombreadas (paneles A-G) indican que el compuesto A, estereoisómero S, atenúa de manera dependiente de la dosis la secreción de fluido neta en el baño con la CE₅₀ de 619 pM (figura 5, panel H).

35 La figura 6 (A-G) ilustra que el compuesto A, estereoisómero S, atenúa de manera dependiente de la dosis la secreción de fluido neta inducida por forskolina en presencia de Ca²⁺ 0,1 mM en la luz. Las barras negras (paneles A-G) indican la absorción de fluido neta en ausencia de forskolina y compuesto A. Las barras blancas indican la secreción de fluido neta en presencia de forskolina (10 μM). Las barras sombreadas (paneles A-G) indican que el compuesto A, estereoisómero S, atenúa de manera dependiente de la dosis la secreción de fluido neta luminal con la CE₅₀ de 756 pM (figura 6, panel H).

Ejemplo 3

40 Este ejemplo demuestra el efecto de Ca²⁺ y calcimiméticos sobre la acumulación de nucleótidos cíclicos estimulada por secretagogo. Se midió la acumulación de nucleótidos cíclicos usando el siguiente método. En resumen, se incubaron suspensiones de células de criptas colónicas a 37°C con forskolina 1 μM (Sigma, Saint Louis, Missouri) durante 15 min., guanilina 1 μM y STa 10 μM durante 45 min. en presencia o ausencia de IBMX 1 mM (3-isobutil-1-metilxantina) (Sigma, Saint Louis, Missouri). Se expusieron las criptas a un tampón Hepes que contenía o bien una baja concentración de Ca²⁺ (Ca²⁺ 0,1 mM) o bien una alta concentración de Ca²⁺ (2 mM) o Gd³⁺ (250 μM). Tras la adición de agonistas y/o IBMX (0 ó 1 mM), se terminaron las reacciones al final de cada punto de tiempo mediante la adición de 2 ml de etanol puro (100%) enfriado con hielo a 1 ml de suspensiones de células de criptas, dando como resultado un volumen de suspensión final del 66% (v/v) de etanol. Se dejaron sedimentar las suspensiones, y entonces se extrajo el sobrenadante a tubos de ensayo. Se lavó el precipitado restante con etanol al 66% (v/v) enfriado con hielo y se añadió a tubos de ensayo apropiados, que se marcan basándose en las concentraciones de

Ca²⁺ e IBMX. Se centrifugaron los extractos a 2000 rpm durante 15 min. a 40°C y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos. Se liofilizaron entonces los extractos mediante centrifugación a vacío a 65°C. Se midieron AMP cíclico y GMP cíclico (en femtomoles por miligramo de proteína celular) usando un kit de inmunoensayo enzimático disponible comercialmente (Amersham, Buckingham, Inglaterra).

5 La figura 7 (A, B) ilustra que forskolina (A) y toxina del cólera (B) inducen la producción de AMPc cuando el CaSR es inactivo (barras negras, Ca²⁺ 0,1 mM). La activación del CaSR por 2,0 mM de Ca²⁺ extracelular atenúa la producción de AMP cíclico inducida por forskolina o toxina del cólera. La adición de isobutil-1-metil-xantina (IBMX), un inhibidor de PDE, revierte este efecto.

10 La figura 7 (C, D) ilustra que guanilina (C) y STa (D) inducen producción de GMPc cuando el CaSR es inactivo (barras negras, Ca²⁺ 0,1 mM). La activación del CaSR por 2,0 mM de Ca²⁺ extracelular atenúa la producción de GMP cíclico inducida por guanilina o STa. La adición de IBMX (1 mM) revierte este efecto.

La figura 8 (A) ilustra que toxina del cólera induce la producción de AMP cíclico cuando el CasR es inactivo (barras negras, Ca²⁺ 0,1 mM). La activación del CasR por 2,0 mM de Ca²⁺ extracelular atenúa la producción de AMP cíclico inducida por toxina del cólera. La adición de IBMX revierte este efecto.

15 La figura 8 (B) ilustra que STa induce la producción de GMP cíclico cuando el CasR es inactivo (barras negras, Ca²⁺ 0,1 mM). La activación del CasR por 2,0 mM de Ca²⁺ extracelular atenúa la producción de GMP cíclico inducida por STa. La adición de IBMX revierte este efecto.

20 La figura 8 (C) ilustra que toxina del cólera induce la producción de AMP cíclico cuando el CasR es inactivo (barras negras, Ca²⁺ 0,1 mM). La adición del calcimimético compuesto A (estereoisómero R) atenúa el AMP cíclico de una manera dependiente de la dosis (barras negras) hasta los niveles de control (barra blanca).

La figura 8 (D) ilustra que guanilina induce la producción de GMP cíclico cuando el CasR es inactivo (barras negras, Ca²⁺ 0,1 mM). La adición del calcimimético atenúa el GMP cíclico de manera dependiente de la dosis (barras negras) hasta los niveles de control (barra blanca).

Ejemplo 4

25 Las figuras 9 A, 9B y 9C demuestran que el compuesto A (estereoisómero R) no tiene ningún efecto sobre Jv neto en ausencia y presencia de forskolina y el inhibidor de PLC U73122 en criptas colónicas de rata. En ausencia de forskolina, los valores de Jv medios indican absorción de fluido neta (A, B y C, barras blancas). La exposición a forskolina y el inhibidor de fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PLC) (U73122, 10 μM) en presencia de calcio 0,1 mM indujo secreción de fluido neta (A, B y C, barras negras). La adición de compuesto A a la luz o el baño no tuvo ningún efecto significativo sobre la reversión de la secreción de fluido neta (A y B, barras negras), lo que indica un papel de la activación de PI-PLC mediada por CasR. La adición de Compuesto A tanto a la parte luminal como al baño no revertió completamente la secreción de fluido neta (C, barras negras).

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra el efecto del calcimimético sobre la toxicidad de TNF-alfa relacionada con P38 en ratones.

35 Se obtuvieron ratones BALB/c hembra (18-20 g) de Charles River Laboratories y se dejaron aclimatar durante al menos dos semanas antes del estudio. Se obtuvo rHu-TNF-alfa de Amgen Protein Sciences. Se dosificó a los ratones por vía oral 2-(((2S)-2-amino-3-fenilpropil)amino)-3-metil-5-(2-naftalenil)-6-(4-piridinil)-4(3H)-pirimidinona (compuesto C) a 10 mg/kg (200 μl/ratón) una hora antes de la exposición con TNF-alfa (10 μg/ratón, i.v.). Se administró compuesto B (N-((6-(metiloxi)-4'-(trifluorometil)-1,1'-bifenil-3-il)metil)-1-feniletanamina) s.c. al mismo tiempo que el compuesto C a dosis de 1, 3, 10 ó 30 mg/kg. Se sacrificaron cinco de 10 ratones de cada grupo de tratamiento a las 3 h tras la administración de TNF-alfa para la determinación de la acumulación de fluido en el intestino delgado. Se diseccionó cuidadosamente la longitud completa del intestino delgado, se sujetaron con pinzas los extremos proximal y distal y se extrajo el intestino delgado intacto de la cavidad abdominal. Se drenó el contenido de fluido luminal intestinal a un tubo cónico y se midió el volumen. Se monitorizaron los 5 ratones restantes de cada grupo para determinar la supervivencia.

45 La figura 10 demuestra que el tratamiento con compuesto B provocaba una reducción dependiente de la dosis en el volumen de fluido que se acumula en el intestino delgado. Los ratones que se dejaron sobrevivir más allá de 3 horas mostraron un 100% de mortalidad tal como se esperaba tras la administración conjunta de compuesto C y TNF-alfa humano. El tratamiento con compuesto B a 10 mg/kg protegió completamente frente a la mortalidad (tabla 5). La dosis inferior de compuesto B protegió parcialmente frente a la mortalidad.

Tabla 5

Datos de mortalidad

| Mortalidad | |
|------------|--|
| | |

| N.º de ratones por observación | 3 h | 6 h | 24 h | Dosis de compuesto B, mg/kg |
|--------------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 5 | 5/5 moribundos | 2/5 muertos | 5/5 muertos | 0 |
| 5 | 5/5 OK | 5/5 moribundos | 5/5 muertos | 1 |
| 5 | 5/5 OK | 5/5 OK | 3/5 muertos 2/5 moribundos | 3 |
| 5 | 5/5 OK | 5/5 OK | 5/5 OK | 10 |

Ejemplo 6

Este experimento demuestra la ausencia de efecto del calcio y un calcimimético sobre la secreción de fluido neta estimulada por secretagogo en ratones dobles mutantes para CaSR.

5 Se crearon ratones deficientes en *Casr* y *Gcm2* dobles tal como se describe en Qisheng Tu *et al.* J. Clin Invest. 111:1029-1037, 2003. La delección del gen *Casr* da como resultado mortalidad posnatal temprana por los efectos tóxicos de la liberación no regulada de hormona paratiroidea (PTH) a partir de células principales paratiroideas así como por los efectos patológicos de la hipercalcemia consiguiente, Ho, C. *et al.* Nature Genetics 11, 389-394, 1995. Glial cells missing 2 (*Gcm2*) es un gen regulador crítico para el desarrollo de las glándulas paratiroideas. La delección de *Gcm2* da como resultado ratones que no tienen glándulas paratiroideas. Gunther, T. *et al.* Nature 406, 199-203, 2000. Sin embargo, estos ratones *Gcm2*^{-/-} presentan un bajo nivel circulante de PTH procedente probablemente del timo, suficiente para mantener la integridad esquelética, y esta fuente de PTH no está regulada por el CaSR (Gunther, T. *et al.* Nature 406, 199-203, 2000; Tu *et al.* J. Clin. Invest. 111 1029-1037, 2003). Por tanto, la delección de *Gcm2* elimina la mortalidad temprana en ratones dobles mutantes para *Casr*.

15 Para evaluar la relevancia funcional del CaSR en células epiteliales del colon, particularmente su capacidad para modular el movimiento del fluido intestinal en estados diarreicos, se eliminaron las criptas colónicas de ratones de tipo natural (*Casr*^{+/+}:*Gcm2*^{+/+} normal) y de ratones en los que se ha delecionado CaSR (*Casr*^{-/-}:*Gcm2*^{-/-}).

La figura 11 resume los cambios en Jv neto en criptas colónicas perfundidas de ratones *Casr*^{+/+}:*Gcm2*^{+/+} y *Casr*^{-/-}:*Gcm2*^{-/-} ratones en ausencia y presencia de agentes que inducen la producción de o bien GMPc (guanilina) o bien AMPc (CTX) antes y después de elevar el calcio extracelular desde 0,1 mM hasta 2 mM en el baño.

20 Los valores de Jv medios indican absorción de fluido neta (figura 11, A y C) en criptas colónicas perfundidas de ratones o bien *Casr*^{+/+}:*Gcm2*^{+/+} o bien *Casr*^{-/-}:*Gcm2*^{-/-} en ausencia de toxinas y con una concentración de calcio de 0,1 mM. La exposición a guanilina o CTX a calcio 0,1 mM indujo secreción de fluido neta (figura 11, A y C; CTX, barras blancas, guanilina, barras negras). La elevación de la concentración de calcio extracelular desde 0,1 mM hasta 2 mM revertió la secreción de fluido neta inducida por guanilina y CTX en las criptas colónicas de ratones *Casr*^{+/+}:*Gcm2*^{+/+} (figura 11A), pero no en las criptas de *Casr*^{-/-}:*Gcm2*^{-/-} (figura 11C).

30 La adición de compuesto A (estereoisómero R), 100 nM, no revertió la secreción de fluido neta inducida por guanilina (barras negras) y CTX (barras blancas) en las criptas colónicas de ratones *Casr*^{-/-}:*Gcm2*^{-/-} en presencia de calcio 0,1 mM (figura 11 D), mientras que la adición de este calcimimético revertió eficazmente la secreción de fluido neta inducida por estos agentes en las criptas colónicas de ratones *Casr*^{+/+}:*Gcm2*^{+/+} en presencia de calcio 0,1 mM (figura 11 B). En la figura 11, los valores son la media ± EEM. Asterisco, P < 0,001 en comparación con sin secretagogo; #, P < 0,01 en comparación con secretagogo sin agonista de CaSR.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra que o bien calcio extracelular o bien compuesto A revierten la secreción de iones cloruro inducida por secretagogo del lado basolateral (sangre-intersticial) a la luz de la cripta en criptas colónicas de rata.

35 La secreción de fluido a la luz de criptas colónicas depende del movimiento de iones cloruro (Cl⁻) por la membrana plasmática luminal a través de los canales de cloruro del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, CFTR. Neves, S.R. *et al.* Science 296, 1636-1639, 2002. Los aumentos inducidos por secretagogo en la acumulación celular de AMPc o GMPc potencian los procesos de fosforilación de PKA y PKG (Golin-Biselo, F. *et al.* Am. J. Cell Physiol. 289, C708-C716, 2005; Neves *et al.*), respectivamente, lo que dirige la translocación de canales de CFTR activados a la membrana plasmática luminal. Igualmente crítico para el transporte de Cl⁻ transepitelial durante la secreción de fluido estimulada por secretagogo es el aumento de la entrada de Cl⁻ en células a partir del fluido basolateral mediante el cotransportador de Na-K-2Cl sensible a bumetanida (NKCC1). Ratones adultos que carecen de NKCC1 presentan respuestas secretoras alteradas a AMPc y STa (Flagella, M. *et al.* J. Biol. Chem. 274, 26946-26955, 1999).

45 *Mediciones de Cl⁻*. Se realizaron mediciones del flujo de entrada de Cl⁻ en las células (Egan, M.E. *et al.*, Nat. Med. 8, 485- 492, 2002) en criptas colónicas superfundidas aisladas sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con Cell-Tak (Cel-Tak™, BD bioscience, Bedford, MA) y se cargaron con MQAE 20 mM [éster (N-6-metoxiquinolil)acetoetilico; Molecular Probes]. Tras la carga del colorante, se incubaron las criptas en un tampón HEPES libre de Cl⁻ hasta que se logró una intensidad de fluorescencia inicial alta estable. Se monitorizaron las tasas de flujo de entrada de Cl⁻ en

células como tasas de reducciones en unidades de fluorescencia de MQAE arbitrarias ($\Delta\text{UFA}/\text{min.}$; ex.: 346 nm; em.: 460 nm).

5 *Efecto de Ca^{2+} y calcimiméticos sobre la entrada de Cl^- basolateral inducida por forskolina en células de criptas colónicas.* Los resultados presentados en la figura 12 (A y B) demuestran que en criptas colónicas perfundidas de rata, la adición basolateral de forskolina en presencia de calcio 0,1 mM estimula la entrada de Cl^- basolateral en células de criptas colónicas (aumento en el Cl^- celular monitorizado por la caída en la fluorescencia de MQAE). En criptas colónicas perfundidas de rata, la adición basolateral de bumetanida 100 μM , que inhibe el flujo de entrada de Cl^- a través del cotransportador de NKCC1, suprimió el aumento estimulado por forskolina en el Cl^- celular mediante la entrada de Cl^- basolateral en células de criptas colónicas. La adición del calcimimético compuesto A (100 nM) al fluido basolateral también redujo significativamente la tasa de entrada de Cl^- estimulada por forskolina. El Ca^{2+} extracelular a una concentración de 0,1 mM no suprimió la entrada de Cl^- basolateral estimulada por CTX en células de criptas colónicas (figura 12B). El aumento de la concentración de calcio desde 0,1 hasta 2 mM inhibió la entrada de Cl^- mediante NKCC1 en presencia de CTX (figura 12B). Los valores en B son la media \pm EEM. Asterisco, $P < 0,01$ en comparación con sin secretagogo, #, $P < 0,01$ en comparación con secretagogo sin inhibidor o agonista de CaSR. El número entre paréntesis es el número de criptas estudiadas. Las concentraciones de calcio (Ca) son en milimolar.

15 Estos estudios demuestran que la activación del CaSR inhibe la actividad de NKCC1, un componente crítico del mecanismo secretor de fluido.

Ejemplo 8

20 Este ejemplo demuestra que o bien calcio extracelular o bien compuesto A revierte la inhibición inducida por secretagogo de la absorción de fluido en criptas colónicas de rata.

25 La pérdida de fluido dependiente de nucleótidos cíclicos en diarreas secretoras se produce a través de la reducción en los procesos de absorción y aumentos en los procesos secretores. Lucas, M. L. J. Appl. Microbiol. 90, 7-26, 2001; Golin-Biselo, F. *et al.* Am. J. Cell Physiol. 289, C708-C716, 2005. Las criptas epiteliales colónicas proporcionan un modelo para entender el transporte de fluido intestinal ya que absorben y secretan simultáneamente fluido dependiendo la dirección de movimiento de fluido neto ($^{\text{neto}}J_v$) de las magnitudes relativas de estos dos procesos. Un componente principal de la absorción de fluido en el colon está mediado por el intercambio de Na^+/H^+ (intercambiador de sodio-hidrógeno, NHE) y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ paralelo localizado en las membranas plasmáticas apicales. Kunzelman, K. *et al.* Physiol. Rev. 82, 245-289, 2002; Donowitz, M. *et al.* Annu. Rev. Physiol. 48, 135-150, 1986. Los nucleótidos cíclicos reducen esta absorción de fluido dependiente de Na^+ inhibiendo la actividad de NHE. En ausencia de secretagogos, la adición de bumetanida al baño basolateral de criptas perfundidas aumentaba el $^{\text{neto}}J_v$ positivo o de absorción debido a la inhibición de una pequeña secreción de fluido restante (figura 13A, segunda barra). Este fluido basal se debía probablemente a los bajos niveles de nucleótidos cíclicos celulares que quedan incluso en ausencia de secretagogos. Por tanto, en presencia de bumetanida, las mediciones de $^{\text{neto}}J_v$ representan el componente de absorción del transporte de fluido. La figura 13A demuestra que este movimiento de fluido de absorción se reducía sustancialmente mediante la adición del dibutiril-AMPc (db-AMP cíclico) permeable en células. En la figura 13B, se inhibió la secreción de fluido mediante la adición de bumetanida al baño basolateral más ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoico (NPPB, un inhibidor de los canales de Cl^-) al perfundido luminal de criptas perfundidas. La figura 13 B demuestra que este movimiento de fluido de absorción se inhibía mediante forskolina. La inhibición de la absorción de fluido mediante AMP cíclico o el secretagogo que genera AMP cíclico, forskolina, contribuiría de manera importante a las diarreas inducidas por secretagogo. O bien el aumento de la concentración de Ca^{2+} extracelular hasta 2 mM (figura 13B) y/o bien la adición de compuesto A (figura 13C) al baño basolateral (en presencia de calcio 0,5 mM) suprimieron significativamente la reducción en la absorción de fluido mediada por AMPc. Para examinar si este último efecto de agonistas de CaSR sobre la absorción de fluido resultaba de la potenciación de la actividad de NHE apical, se evaluaron los efectos de Ca^{2+} sobre la extrusión de protones dependiente de Na^+ a partir de colonocitos en presencia de forskolina. Se aumento la actividad de NHE 8 veces elevando el Ca^{2+} en el baño basolateral desde 0,1 hasta 2 mM, y la adición de compuesto A al baño que contenía Ca^{2+} 2 mM dio como resultado un aumento adicional en la actividad de NHE hasta 12 veces (figura 13D). Se logró la carga ácida de las células mediante exposición a NH_4Cl y se evaluó la recuperación del pH celular dependiente de Na^+ tras la eliminación de NH_4Cl como índice de la actividad de Na^+/H^+ . Singh *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 92 11573-11577, 1995. Los valores en A-D son la media \pm EEM. Asterisco, $P < 0,01$ en comparación con sin secretagogo, #, $P < 0,01$ en comparación con secretagogo sin inhibidor o agonista de CaSR. El número entre paréntesis es el número de criptas estudiadas. Las concentraciones de calcio (Ca) son en milimolar.

Ejemplo 9

55 Este ejemplo demuestra el efecto del calcimimético sobre la acumulación de fluido gastrointestinal inducida por toxina del cólera en ratones.

Se obtuvieron ratones BALB/c hembra (18-20 g) de Charles River Laboratories y se dejaron aclimatar durante al menos dos semanas antes del estudio. Se obtuvo toxina del cólera de Biomol (toxina del cólera purificada a partir de *Vibrio cholerae*, libre de azida). Se mantuvieron en ayuno los ratones ($n=5/\text{grupo}$) durante la noche antes de la administración oral de toxina del cólera a 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. Se les administró a los ratones vehículo o compuesto B por

vía oral a 30 ó 100 mg/kg un hora antes de la administración de toxina del cólera (50 µg/ratón, por vía oral). Otro grupo de ratones recibió compuesto B a 20 mg/kg por vía intravenosa (vena de la cola) un hora antes de la toxina del cólera (50 µg/ratón por vía oral). Se sacrificaron los ratones 6 horas tras la administración de la toxina del cólera para la determinación de la acumulación de fluido gastrointestinal. Se diseccionó cuidadosamente la longitud completa del intestino delgado, se sujetaron con pinzas los extremos proximal y distal y se extrajo el intestino delgado intacto de la cavidad abdominal. Se drenó el fluido luminal intestinal en un tubo cónico y se midió el volumen.

La figura 14 ilustra que el tratamiento con compuesto B dio como resultado una reducción estadísticamente significativa de la acumulación de fluido gastrointestinal inducida por toxina del cólera, a dosis de 100 mg/kg por vía oral, o 20 mg/kg por vía intravenosa. Panel A, control; panel B, vehículo; panel C, 20 mg/kg i.v.; panel D, 30 mg/kg v.o.; panel E, 100 mg/kg v.o.; *p < 0,05 frente a control de vehículo mediante análisis de Bonferroni/Dunn.

Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra que los calcimiméticos actúan mediante la ruta directa en el colon o bien proximal o bien distal en el modelo de cripta perfundida.

En seres humanos y roedores normales, el sistema nervioso entérico (principalmente el plexo submucoso) libera agentes que regulan la secreción de fluido (Cooke, H.J. (1998) *News Physiol. Sci* 13:269274; Field, M. (2003) *J. Clin. Invest.* 111: 931-943). Hay pruebas procedentes de estudios *in vivo* de que el sistema nervioso entérico desempeña un papel en la secreción de fluido inducida por enterotoxinas (por ejemplo, toxina del cólera y STa) en el intestino (Field, M. citado anteriormente). Esto se ha determinado mediante el uso de tetrodotoxina (TTX), un veneno neural y un potente bloqueante de canales de sodio que inhibe la propagación del potencial de acción neuronal. Se ha sugerido que TTX revierte la secreción de fluido inducida por toxina del cólera en el intestino. Estudios han mostrado que el efecto de enterotoxinas que provocan diarreas secretoras puede ser al menos en parte mediante la activación del sistema nervioso entérico (SNE) a través de la activación de células enterocromafines (CE) (Burleigh *et al.* (1997) *Dig Dis Sci*, 42: 1964-1968; Field M. citado anteriormente). Además, el CaSR no sólo se expresa en células epiteliales intestinales, sino también en el sistema nervioso entérico, tal como el plexo mientérico en músculo liso y el plexo submucoso (Chattopadhyay, N *et al.* (1998) *Am. J. Physiol.* 274: G122-G130). Esto sugeriría que la presencia del CaSR en el sistema nervioso entérico puede desempeñar un papel en la modulación de la secreción de fluido.

La secreción de fluido estimulada por secretagogos (por ejemplo, forskolina, toxina del cólera, STa) puede estar mediada por cualquiera (o ambas) de activación directa de células epiteliales intestinales (ruta directa) y activación indirecta de células intestinales mediante el CE-SNE (ruta indirecta). Los secretagogos que activan directamente células intestinales que pueden secretar cloruro no se ven afectados por TTX mientras que el efecto de secretagogos que activan la ruta de secreción indirecta de CE-SNE se suprime mediante esta neurotoxina. Por tanto, puede usarse TTX para distinguir si un secretagogo funciona mediante las rutas directa o indirecta. La incapacidad de TTX para suprimir o disminuir la secreción de fluido es una prueba de la ausencia de participación del SNE en la secreción de fluido. La preparación de criptas aisladas carece de células enterocromafines-sistema nervioso entérico intactos pero expresa el CaSR en células epiteliales de la cripta. Por tanto, se usó la preparación de criptas aisladas para someter a prueba si TTX influye en la capacidad de los calcimiméticos para revertir la secreción de fluido neta inducida por forskolina mediante activación directa de células epiteliales de la cripta.

Ruta enterocítica directa

Para estudiar el efecto directo de calcimiméticos sobre la secreción de fluido estimulada por forskolina, se usó el protocolo de criptas perfundidas convencional tal como se describe en Geibel *et al.* (2006) *Nat'l Acad. Sci. Proc.* 103(25): 9390-9397. Se analizaron todos los datos tal como se describe en Geibel *et al.* En resumen, se diseccionaron a mano criptas del colon proximal y distal a partir de segmentos intestinales de ratas Sprague-Dawley adultas y entonces se montaron entre pipetas de vidrio concéntricas para permitir la perfusión independiente de la luz de la cripta y la sangre-superficie intersticial. Se usó la actividad de [³H]inulina, un marcador de volumen no absorbible, para cuantificar la absorción o secreción de fluido por la cripta perfundida.

La figura 15 demuestra que TTX 2 µM no tiene ningún efecto sobre la magnitud de la secreción de fluido inducida por forskolina o la capacidad del calcimimético (compuesto A, 100 nM) para revertir el aumento estimulado por forskolina en la absorción de fluido tanto en el colon proximal (panel A) como el colon distal (panel B) en el modelo de criptas perfundidas. En ambos paneles, barras A: control (perfundido de Ca²⁺ 0,1 mM y disolución de Ringer del baño), barras B: Ca²⁺ 0,1 mM + forskolina 500 nM; barras C: Ca²⁺ 0,1 mM + forskolina 500 nM + TTX 2 µM; barras D: Ca²⁺ 0,1 mM + forskolina 500 nM + TTX 2 µM + compuesto A 100 nM. Asterisco, P < 0,01 en comparación con sin secretagogo, #, P < 0,01 en comparación con secretagogo sin inhibidor o agonista de CaSR.

En ausencia de forskolina, los valores de J_v medios indican absorción de fluido neta en criptas colónicas tanto proximales (A, barra blanca; 0,31 ± 0,02 nl/min./mm) como distales (B, barra blanca; 0,36 ± 0,01 nl/min./mm). La exposición a forskolina (barras B, ambos paneles) indujo secreción de fluido neta en criptas colónicas tanto proximales como distales (-0,32 ± 0,02 nl/min./mm, proximal; -0,33 ± 0,01 nl/min./mm, distal). La adición de TTX no

cambió la capacidad de la forskolina para inducir una secreción de fluido neta en colon tanto proximal como distal (ambos paneles, barras C). Las barras D, ambos paneles, indican que el calcimimético compuesto A atenúa la secreción de fluido neta inducida por forskolina y que la presencia de TTX no tenía influencia sobre esta respuesta farmacológica en colon tanto proximal como distal. Estos datos son consecuentes con la falta de células enterocromafines-sistema nervioso entérico intactos en criptas aisladas y con que los calcimiméticos actúan mediante la ruta directa en colon o bien proximal o bien distal en el modelo de criptas profundidas.

Ejemplo 11

Este experimento demuestra que los calcimiméticos pueden suprimir la secreción de fluido y que este efecto está mediado por células enterocromafines-sistema nervioso entérico (CE-SNE), tal como se demuestra usando el modelo de cámara de Ussing. Se demuestra además que los calcimiméticos son eficaces en colon tanto proximal como distal, así como en animales tanto lactantes como adultos.

Células enterocromafines-sistema nervioso entérico (CE-SNE) y el modelo de cámara de Ussing

Tal como se establece en el ejemplo 10, el efecto de enterotoxinas que provocan diarreas secretoras puede ser al menos en parte mediante activación del sistema nervioso entérico (SNE) a través de la activación de células enterocromafines (CE) y que la presencia del CaSR en el sistema nervioso entérico puede desempeñar un papel en la modulación de la secreción de fluido. Las enterotoxinas activan células enterocromafines intestinales para que liberen 5-hidroxitriptamina (5-HT) que estimula el sistema nervioso entérico mediante receptores 5-HT_{1b}. El sistema nervioso entérico envía señales a enterocitos para que secreten fluido mediante el péptido intestinal vasoactivo y otros factores (secretagogos). La aplicación de enterotoxinas estimula aumentos en AMPc y GMPc en células enterocromafines y esto desencadena que estas células liberen péptidos activos sobre neuronas que median el aumento en la secreción de fluido intestinal (Cooke; Field, citado anteriormente). Este mecanismo mediado por CE-SNE de la diarrea (secreción de fluido) puede inhibirse por la neurotoxina, tetrodotoxina (TTX), que actúa sobre el SNE bloqueando la liberación de secretagogos.

Se estudió la secreción de fluido intestinal inducida por enterotoxinas y el efecto de los calcimiméticos sobre el equilibrio de fluidos usando un modelo *in vitro*, la cámara de Ussing. Este modelo implica la ruta de CE-SNE y se describe en detalle en Li, H. *et al.* (2004) *J. Cyst. Fibrosis* 3: 123-126. En resumen, se aíslan segmentos de colon proximal o distal de ratas Sprague-Dawley lactantes (2-3 semanas de edad) o adultas jóvenes (6-7 semanas de edad) y se colocan en tampón enfriado con hielo. Se cortan pequeños trozos de colon de grosor completo y se montan en una cámara de Ussing de plexiglás con disolución de Ringer libre de bicarbonato tanto en la cámara mucosa como en la cámara serosa. Se gasifica la cámara serosa con un 100% de O₂ y se calientan los fluidos tanto seroso como mucoso a 37°C. Cuando el voltaje transepitelial de circuito abierto es estable, se cortocircuita el tejido y se monitoriza la corriente de cortocircuito (I_{cc} ; $\mu A/cm^2$). La corriente de cortocircuito (I_{cc}) se define como el flujo de carga por tiempo cuando el tejido se cortocircuita.

La figura 16 demuestra que la capacidad de los calcimiméticos para revertir el aumento estimulado por forskolina en la corriente de cortocircuito (I_{cc}) se suprime mediante TTX en ratas adultas jóvenes. Se realizó el experimento usando ratas Sprague-Dawley de 6-7 semanas de edad. Se notificaron los datos de la cámara de Ussing o bien como I_{cc} total ($\mu A/cm^2$) o bien como la tasa de cambio en I_{cc} ($\mu A/cm^2 \cdot min.$) antes (control) frente a después de la adición de compuesto A. Se determinaron las tasas mediante regresión lineal. Para todos los experimentos, se muestra también un trazo representativo de corriente I_{cc} frente al tiempo a partir del colon distal.

En el panel A, la adición de 500 nM de forskolina (5 min., primera flecha) al baño en ausencia de TTX indujo un aumento en la I_{cc} negativa en el colon proximal, indicando la secreción de fluido inducida por forskolina. Esto se revertió mediante la aplicación al baño de 10 μM de compuesto A (20 min., segunda flecha). Los resultados presentados en el panel C indican que en presencia de 2 μM de TTX, la adición de 10 μM de compuesto A (25 min., segunda flecha) no tuvo prácticamente ningún efecto sobre la I_{cc} inducida por forskolina, en contraposición a la disminución en I_{cc} mediante compuesto A en ausencia de TTX (panel A). Los paneles B y D resumen la tasa de cambio en I_{cc} ($\mu A/cm^2 \cdot min.$), eje Y, antes (control) frente a después de la adición de compuesto A en colon proximal y distal. Panel B, sin TTX: A, colon proximal, control (antes de añadir compuesto A); B, colon proximal, después de la adición de compuesto A 10 μM ; C, colon distal, control (antes de añadir compuesto A); D, colon distal, después de la adición de compuesto A 10 μM . Panel D, TTX 2 μM : A, colon proximal, control (antes de añadir compuesto A); B, colon proximal, después de la adición de compuesto A 10 μM ; C, colon distal, control (antes de añadir compuesto A); D, colon distal, después de la adición de compuesto A 10 μM .

La figura 17 demuestra que la capacidad de los calcimiméticos para revertir el aumento estimulado por forskolina en la corriente de cortocircuito (I_{cc}) se suprime mediante TTX en animales lactantes. Se realizó el experimento tal como se describió anteriormente usando ratas Sprague-Dawley de 2-3 semanas de edad. De manera similar al experimento ilustrado en la figura 16, la adición de 500 nM de forskolina (figura 17, panel A; 5 min., primera flecha) al baño en ausencia de TTX indujo un aumento en la I_{cc} negativa en el colon distal, indicando la secreción de fluido inducida por forskolina. Esto se revertió mediante la aplicación al baño de 10 μM de compuesto A (18 min., segunda flecha). Los resultados presentados en el panel C indican que en presencia de 2 μM de TTX, la adición de 10 μM de compuesto A (22 min., segunda flecha) no tuvo prácticamente ningún efecto sobre la I_{cc} inducida por

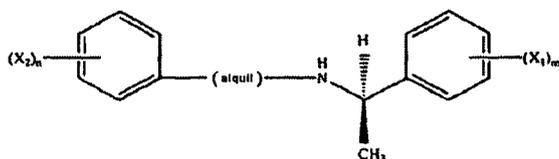
5 forskolina, en contraposición a la disminución en I_{cc} mediante compuesto A en ausencia de TTX (panel A). Los paneles B y D resumen la tasa de cambio en I_{cc} ($\mu A/cm^2min.$), eje Y, antes (control) frente a después de la adición de compuesto A en colon proximal y distal. Panel B, sin TTX: A, colon proximal, control; B, colon proximal, compuesto A 10 μM ; C, colon distal, control; D, colon distal, compuesto A 10 μM . Panel D, TTX 2 μM : A, colon proximal, control; B, colon proximal, compuesto A 10 μM ; C, colon distal, control; D, colon distal, compuesto A 10 μM .

Esto demuestra que los calcimiméticos pueden suprimir la secreción de fluido en colon tanto proximal como distal de animales lactantes o adultos y que este efecto de los calcimiméticos está mediado mediante células enterocromafines-sistema nervioso entérico (CE-SNE).

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un compuesto calcimimético para la preparación de una composición farmacéutica para tratar diarrea en un sujeto, en el que

a) el compuesto calcimimético es un compuesto de fórmula I



5

I

en la que:

10 X_1 , y X_2 , que pueden ser idénticos o diferentes, son cada uno un radical elegido de radicales CH_3 , CH_3CH_2O , Br, Cl, F, CF_3 , CHF_2 , CH_2F , OH, CH_2OH , $CONH_2$, CN, NO_2 , CH_3CH_2 , propilo, butilo, isobutilo, t-butilo, acetoxilo y acetilo, o dos de X_1 pueden formar juntos un radical metilendioxilo, o dos de X_2 pueden formar juntos un radical metilendioxilo; siempre que X_2 no sea un radical 3-t-butilo;

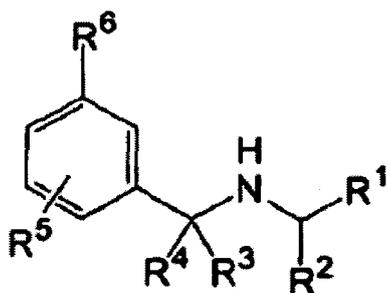
n oscila entre 0 y 5;

m oscila entre 1 y 5; y

15 el radical alquilo se elige de radicales alquilo C1-C3, que están sustituidos opcionalmente con al menos un grupo elegido de grupos alquilo C1-C9 saturados e insaturados, lineales, ramificados y cíclicos, grupos dihidroindolilo y tiodihidroindolilo y grupos 2-, 3- y 4-piperidinilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

b) el compuesto calcimimético es un compuesto de fórmula II



20

II

en la que:

R^1 es arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R^2 es alquilo o haloalquilo;

R^3 es H, alquilo o haloalquilo;

25

R^4 es H, alquilo o haloalquilo;

cada R^5 presente se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alcoxilo, alcoxilo sustituido, halógeno, $-C(=O)OH$, $-CN$, $-NR^dS(=O)_mR^d$, $-NR^dC(=O)NR^dR^d$, $-NR^dS(=O)_mNR^dR^d$ o $-NR^dC(=O)R^d$;

R^6 es arilo, arilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

cada R^a es, independientemente, H, alquilo o haloalquilo;

cada R^b es, independientemente, arilo, aralquilo, heterociclilo o heterocicilalquilo, cada uno de los cuales puede estar no sustituido o sustituido con hasta 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo, halógeno, haloalquilo, alcoxilo, ciano y nitro;

5 cada R^c es, independientemente, alquilo, haloalquilo, fenilo o bencilo, cada uno de los cuales puede estar sustituido o no sustituido;

10 cada R^d es, independientemente, H, alquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo o heterocicilalquilo en el que el alquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo y heterocicilalquilo están sustituidos con 0, 1, 2, 3 ó 4 sustituyentes seleccionados de alquilo, halógeno, haloalquilo, alcoxilo, ciano, nitro, R^b, -C(=O)R^c, -OR^b, NR^aR^a, NR^aR^b, -C(=O)OR^c, -C(=O)NR^aR^a, -OC(=O)R^c, -NR^aC(=O)R^c, -NR^aS(=O)_nR^c y -S(=O)_nNR^aR^a;

m es 1 ó 2;

n es 0, 1 ó 2; y

p es 0, 1, 2, 3 ó 4;

15 siempre que si R² es metilo, p es 0 y R⁶ es fenilo no sustituido, entonces R¹ no es 2,4-dihalofenilo, 2,4-dimetilfenilo, 2,4-dietilfenilo, 2,4,6-trihalofenilo o 2,3,4-trihalofenilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

c) el compuesto calcimimético es N-(3-[2-clorofenil]-propil)-R- α -metil-3-metoxibencilamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

20 d) el compuesto calcimimético es N-((6-(metiloxi)-4'-(trifluorometil)-1,1'-bifenil-3-il)metil)-1-feniletanamina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o

e) el compuesto calcimimético es cinacalcet HCl.

2. Compuesto calcimimético según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de diarrea.

3. Uso de al menos un compuesto calcimimético para la preparación de una composición farmacéutica para disminuir la secreción de fluido intestinal en un sujeto.

25 4. Uso según la reivindicación 3, en el que se aumenta la absorción de fluido.

5. Uso según la reivindicación 3, en el que el sujeto se prepara para una operación quirúrgica.

6. Uso de al menos un compuesto calcimimético para la preparación de una composición farmacéutica para regular la absorción o secreción de un fármaco o nutriente en el tubo digestivo de un sujeto, en el que se aumenta la absorción de fármaco o nutriente.

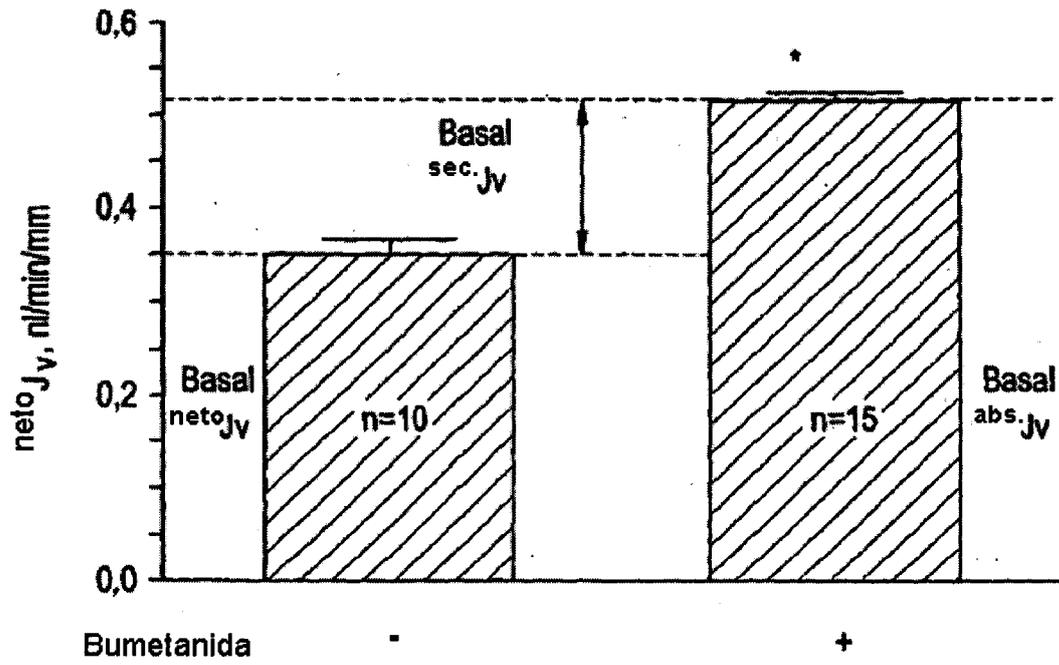
30 7. Uso según la reivindicación 6, en el que el sujeto padece malnutrición o malasimilación.

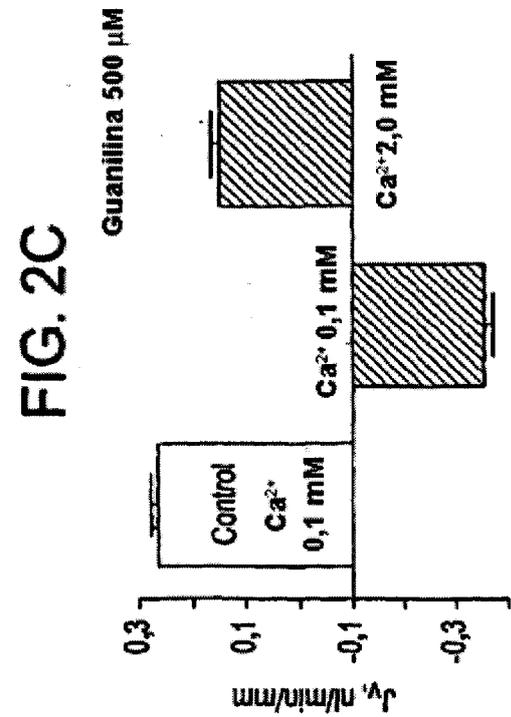
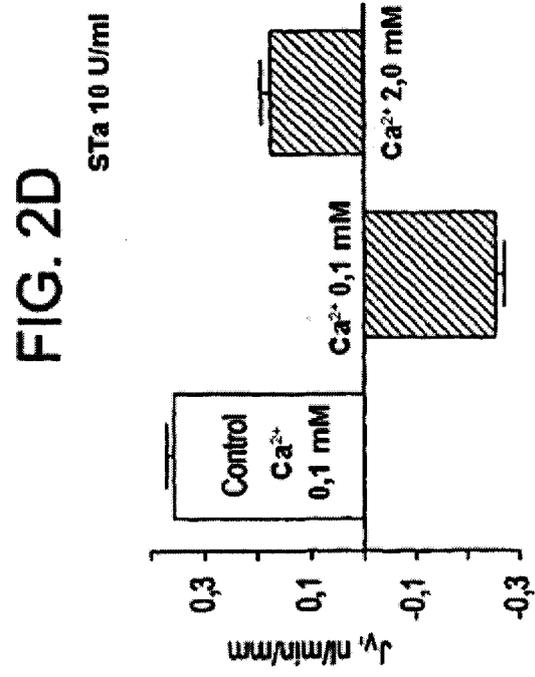
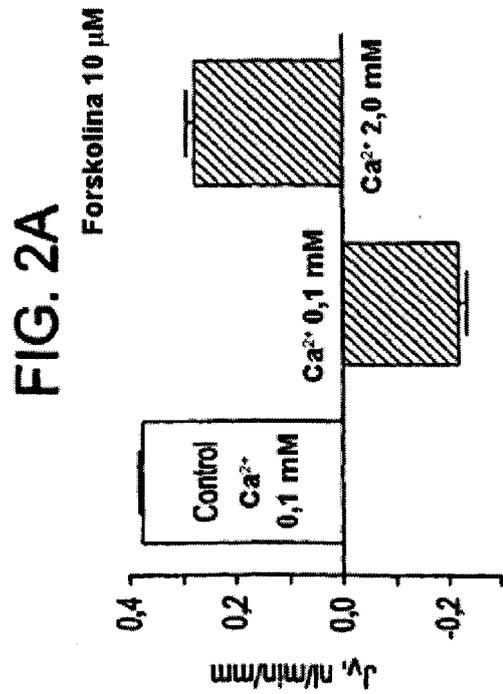
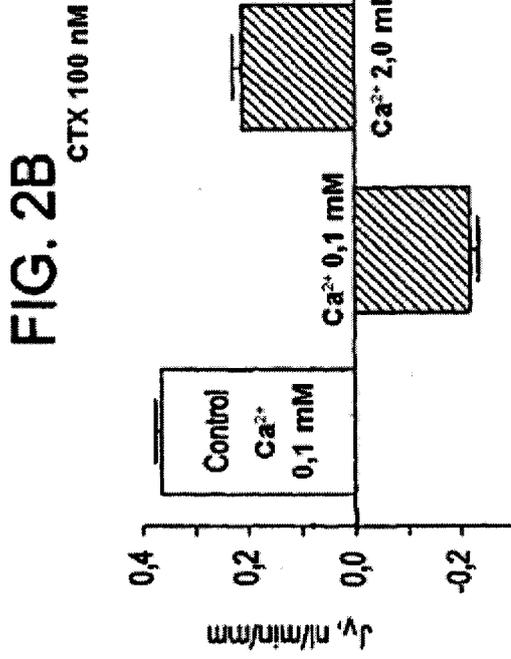
8. Uso de al menos un compuesto calcimimético para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una malasimilación o una malnutrición de un sujeto, en el que la malasimilación se debe a trastornos de mezclado, insuficiencia pancreática, concentración intestinal de sales biliares reducida, superficie de absorción inadecuada, defectos de absorción de la mucosa, circulación enterohepática interrumpida de sales biliares u obstrucción linfática.

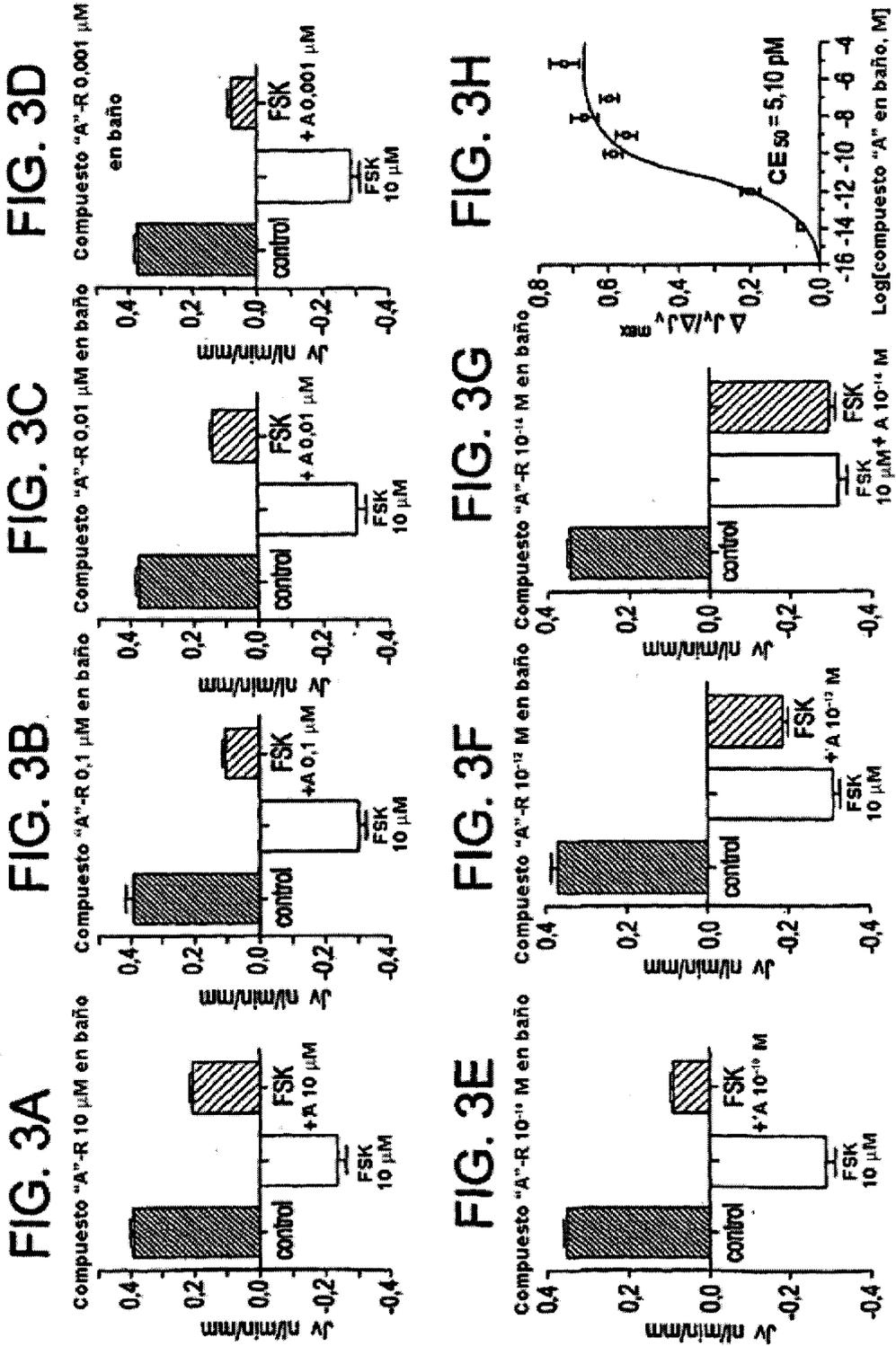
35

9. Uso según la reivindicación 8, en el que el sujeto padece malnutrición.

FIG. 1







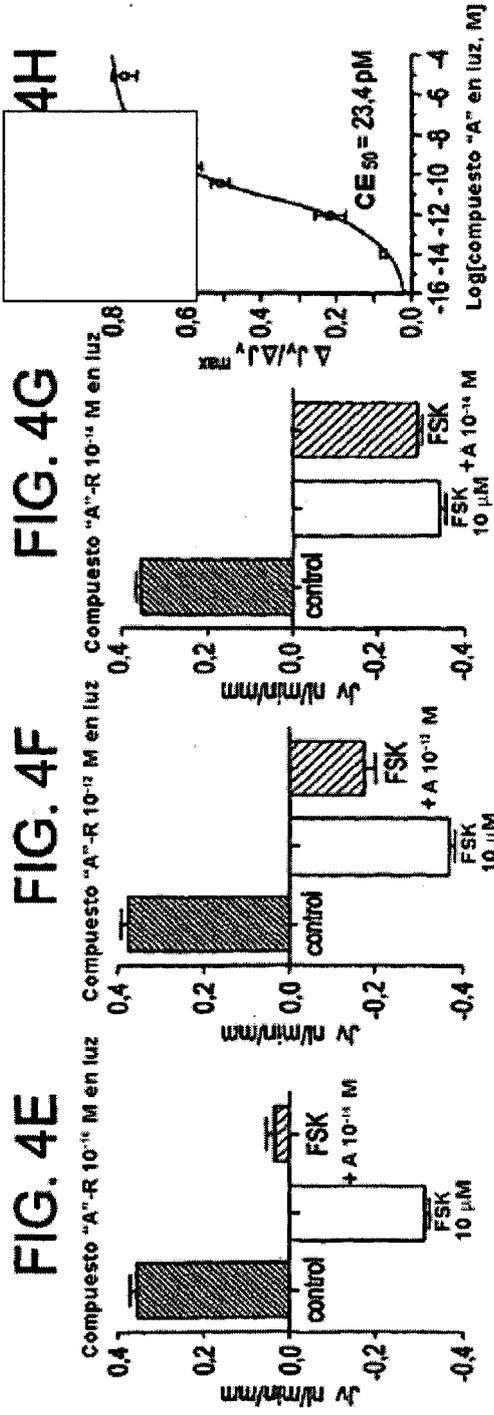
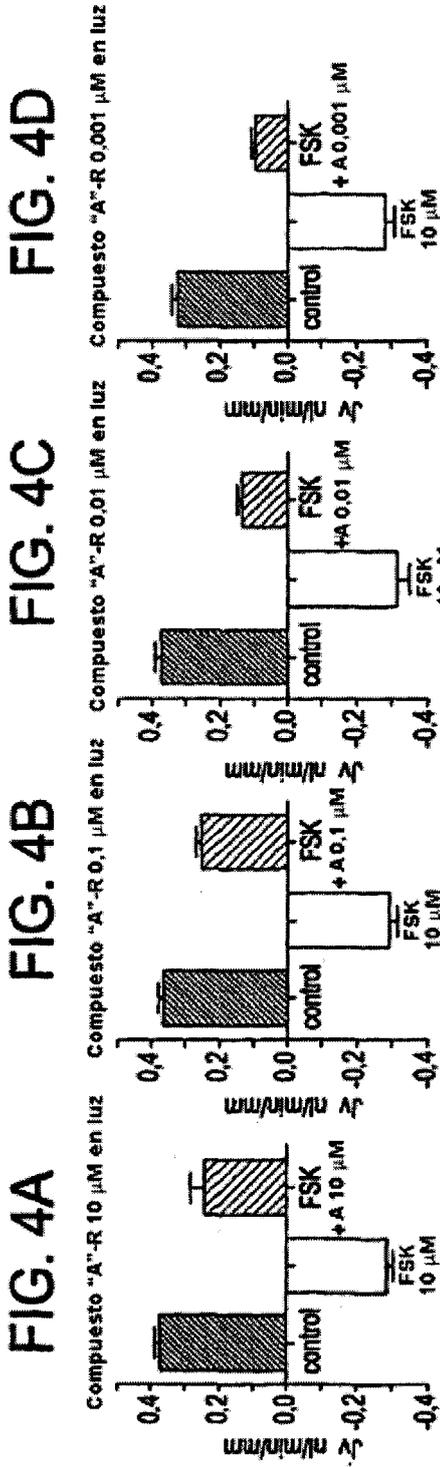


FIG. 5A FIG. 5B FIG. 5C FIG. 5D

Compuesto "A"-S 10 μM en baño Compuesto "A"-S 0,1 μM en baño Compuesto "A"-S 0,01 μM en baño Compuesto "A"-S 0,001 μM en baño

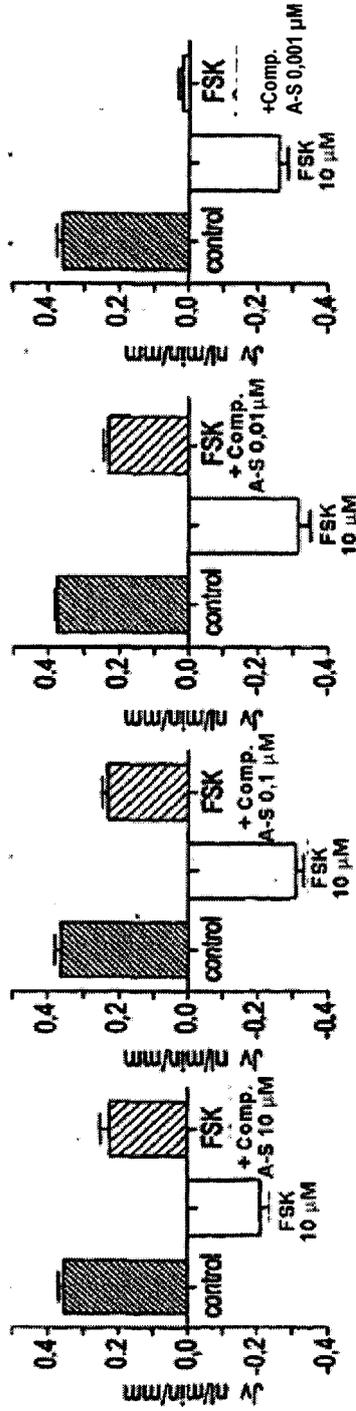
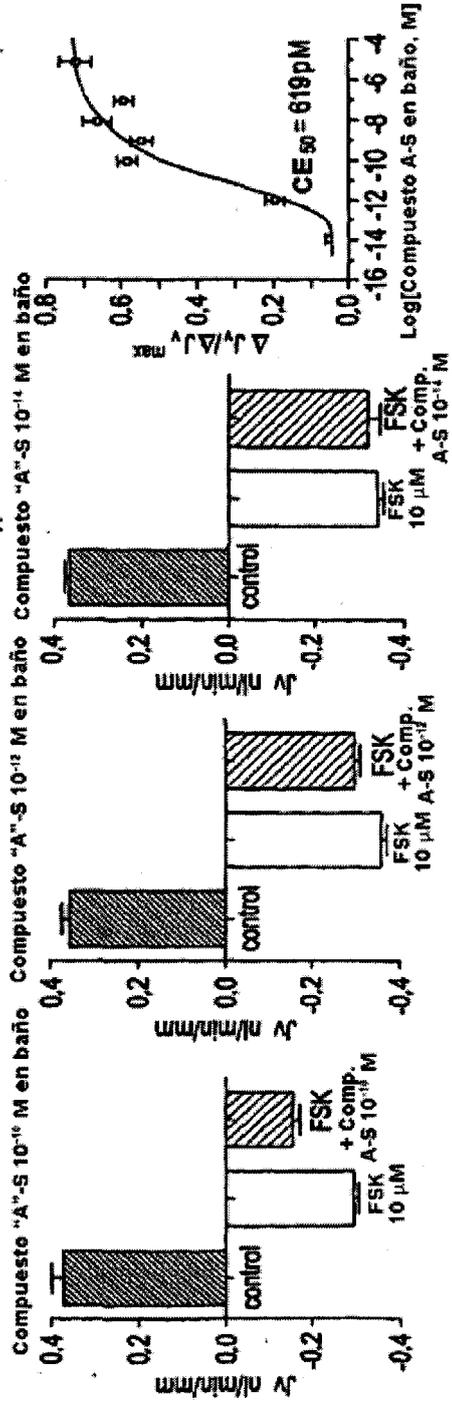
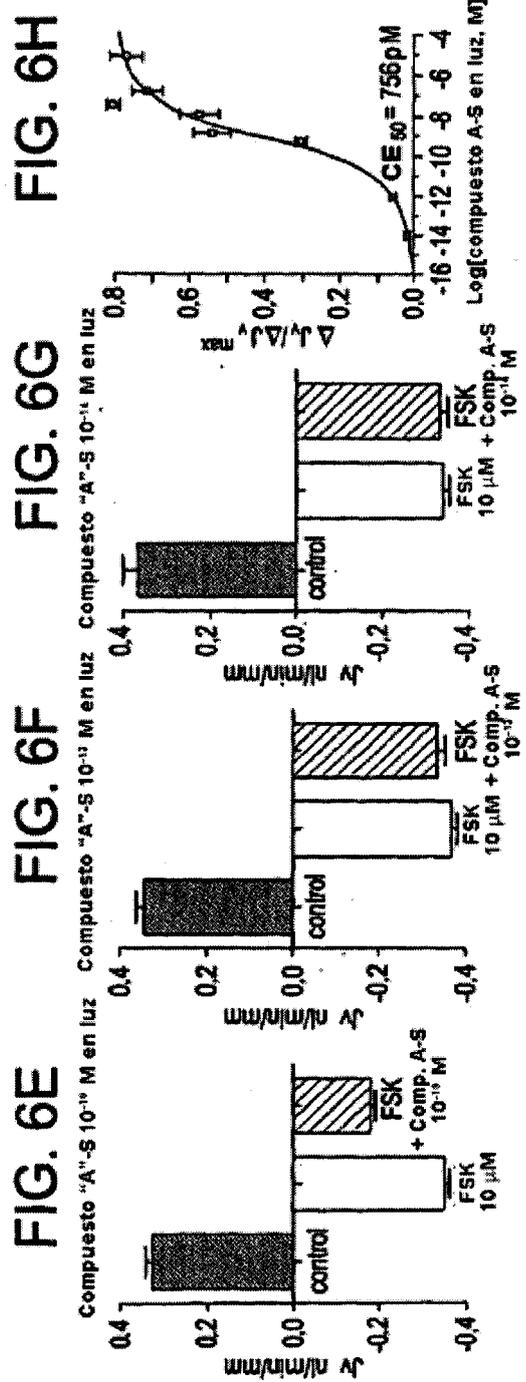


FIG. 5E FIG. 5F FIG. 5G FIG. 5H





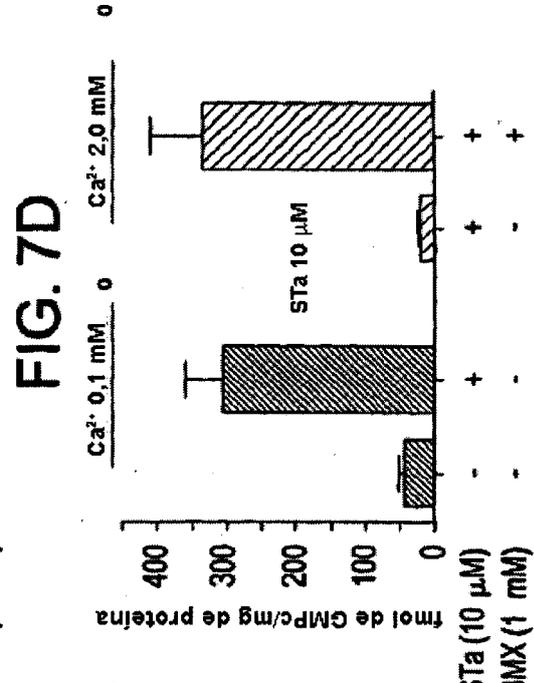
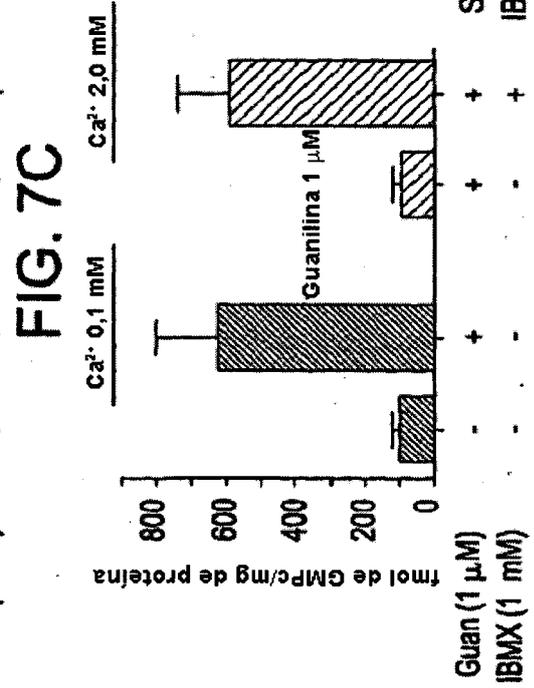
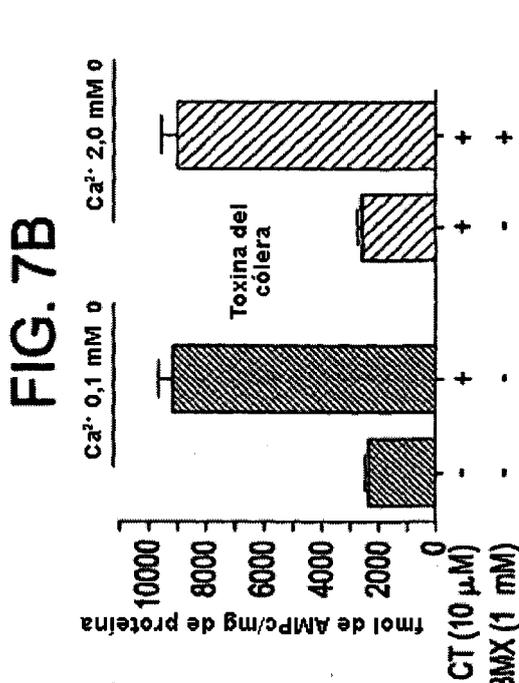
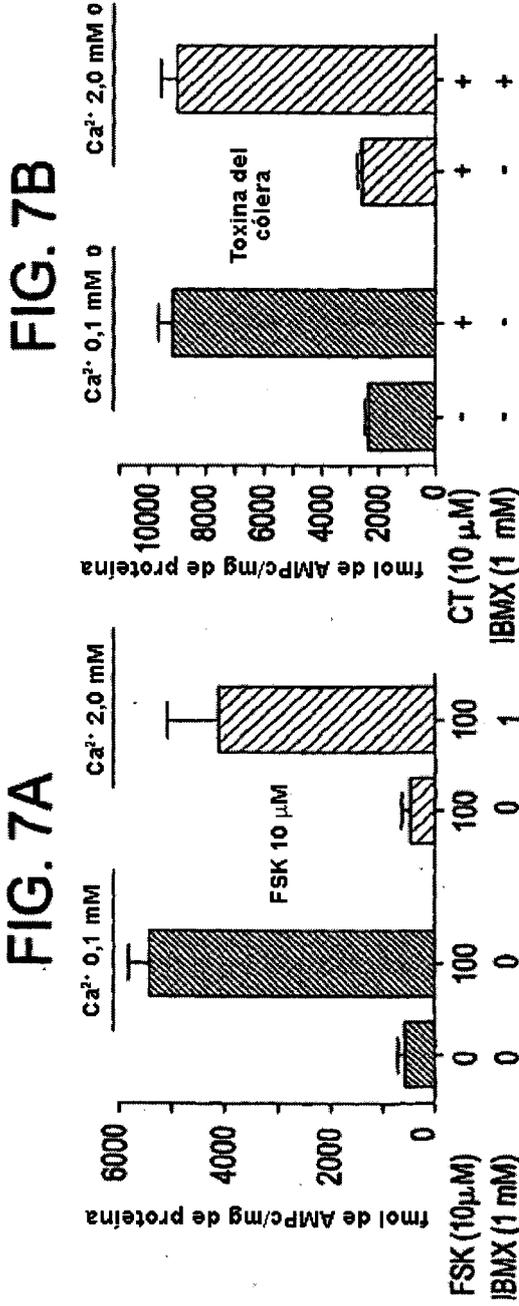


FIG. 8A

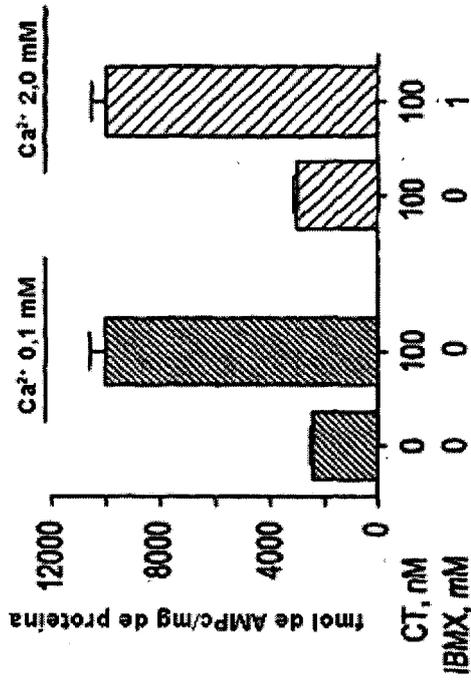


FIG. 8C

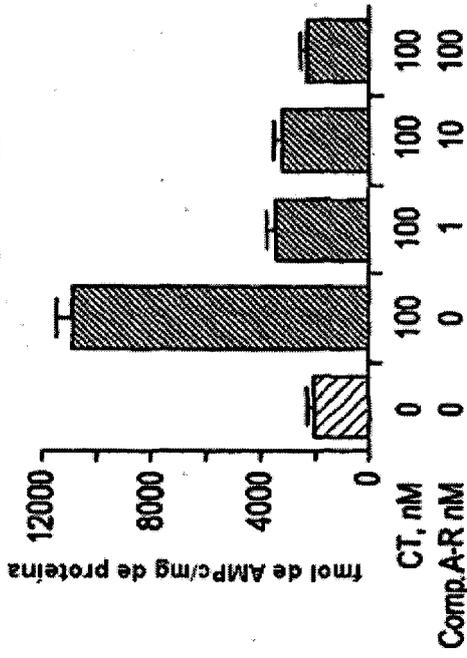


FIG. 8B

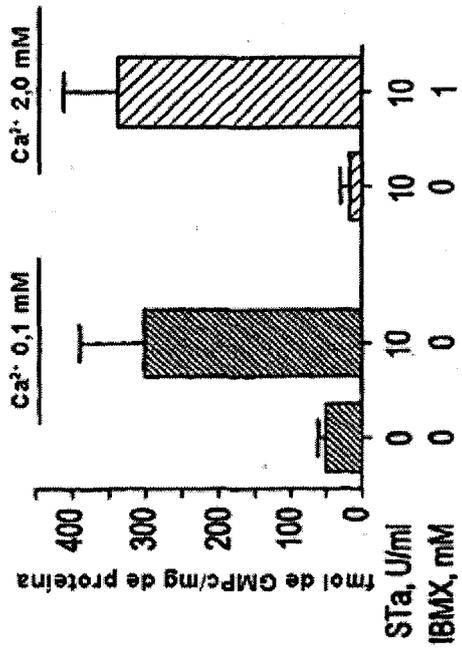


FIG. 8D

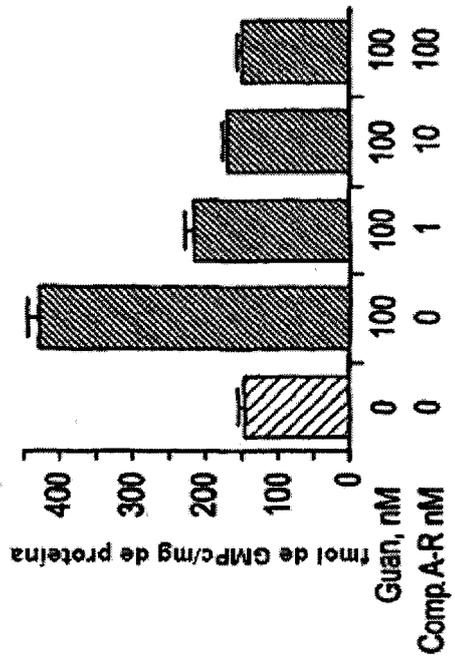


FIG. 9B

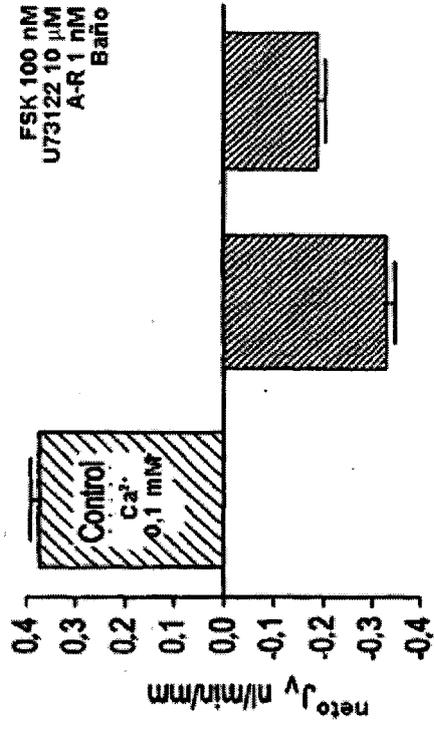


FIG. 9C

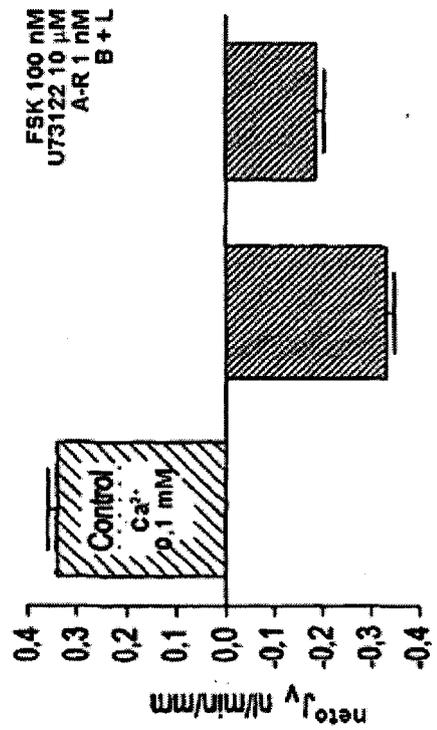


FIG. 9A

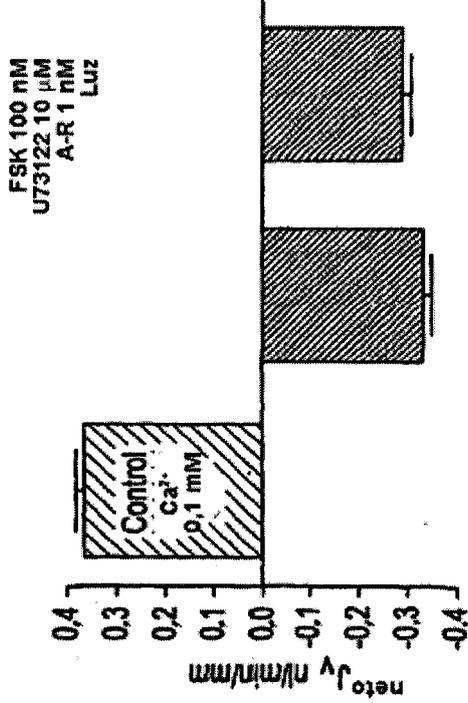


FIG. 10

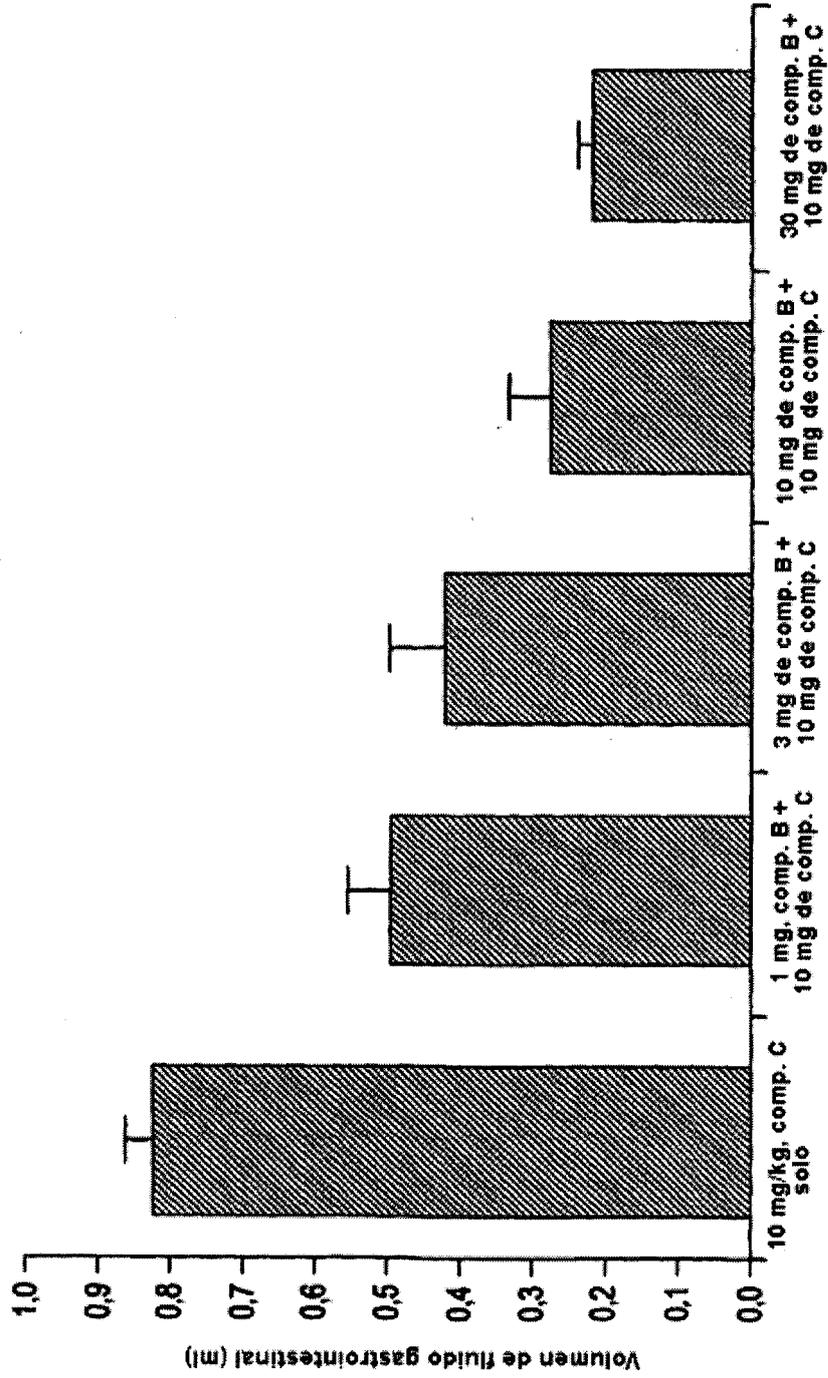


FIG. 11B

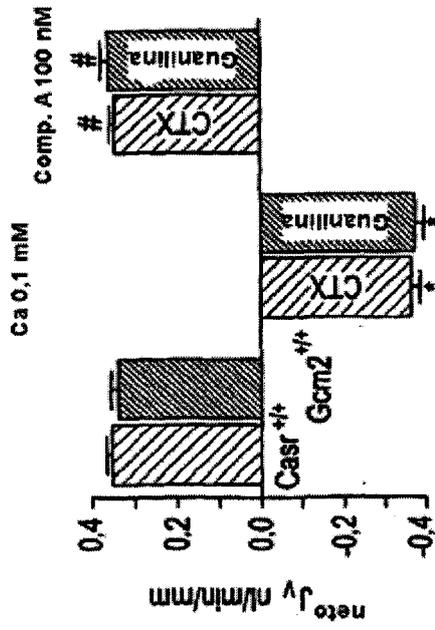


FIG. 11D

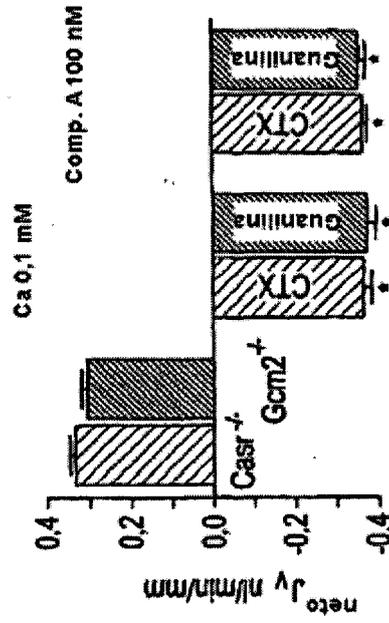


FIG. 11A

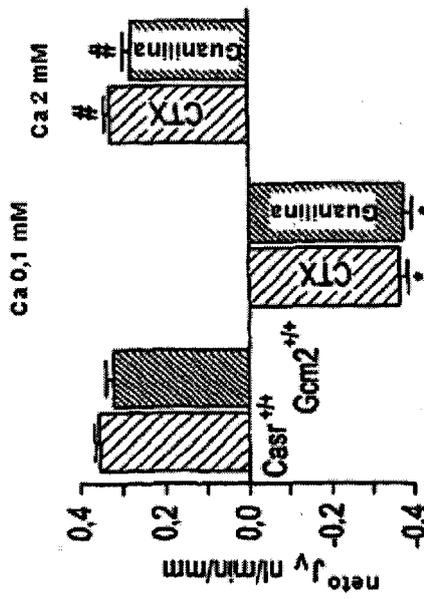


FIG. 11C

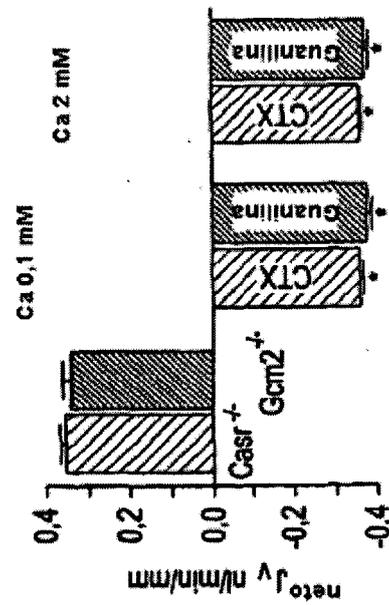


FIG. 12A

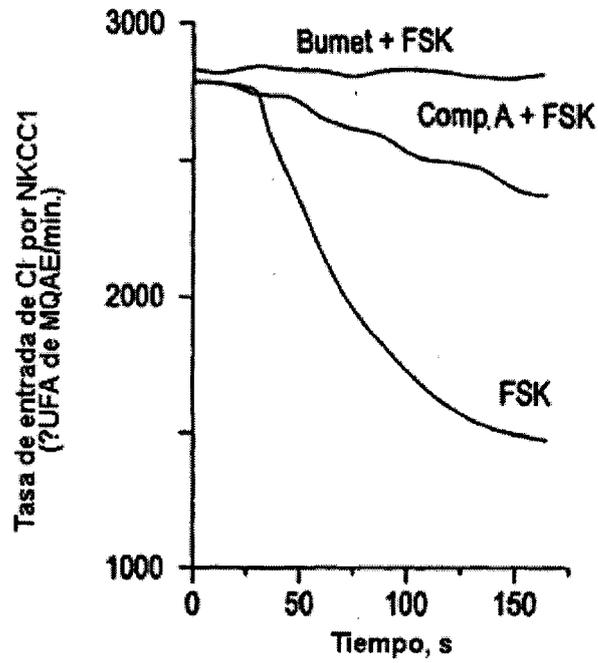


FIG. 12B

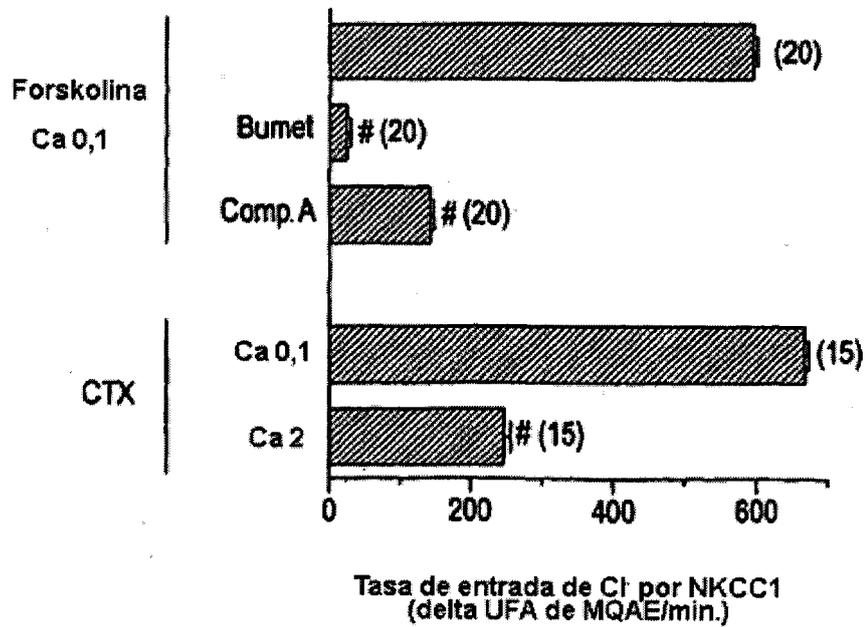


FIG. 13A

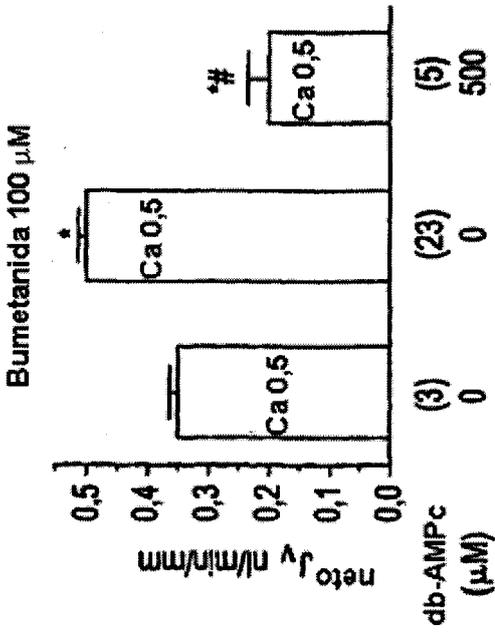


FIG. 13B

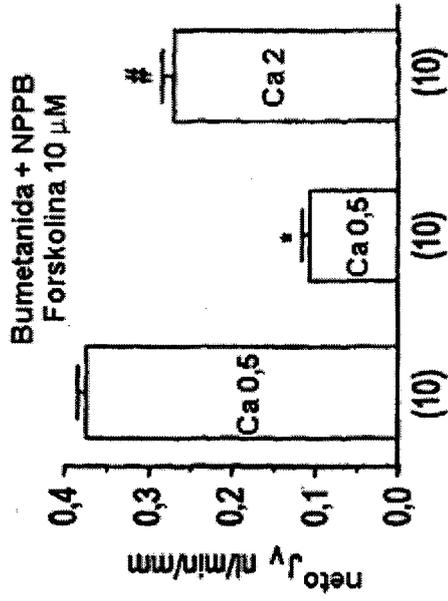


FIG. 13C

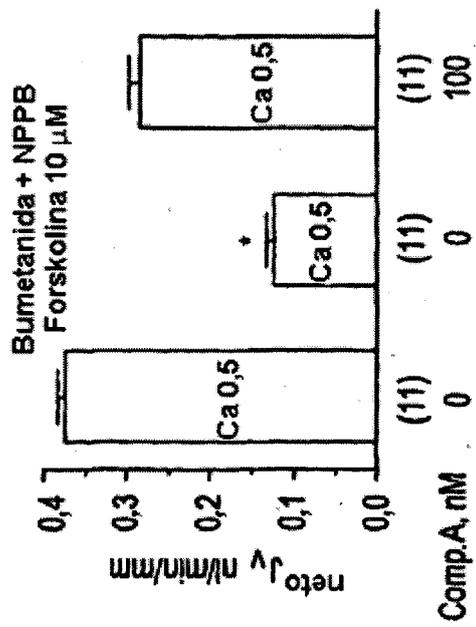


FIG. 13D

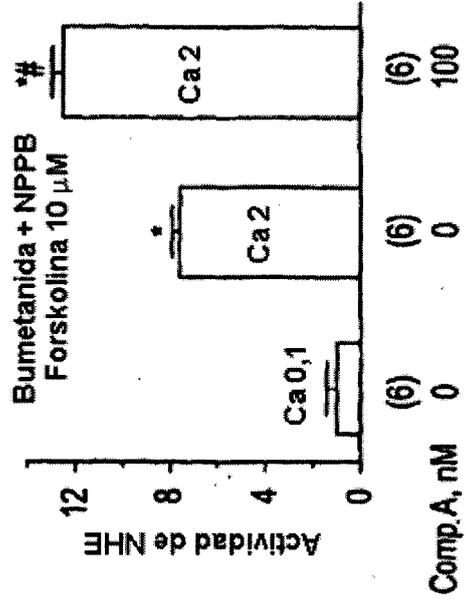


FIG. 14

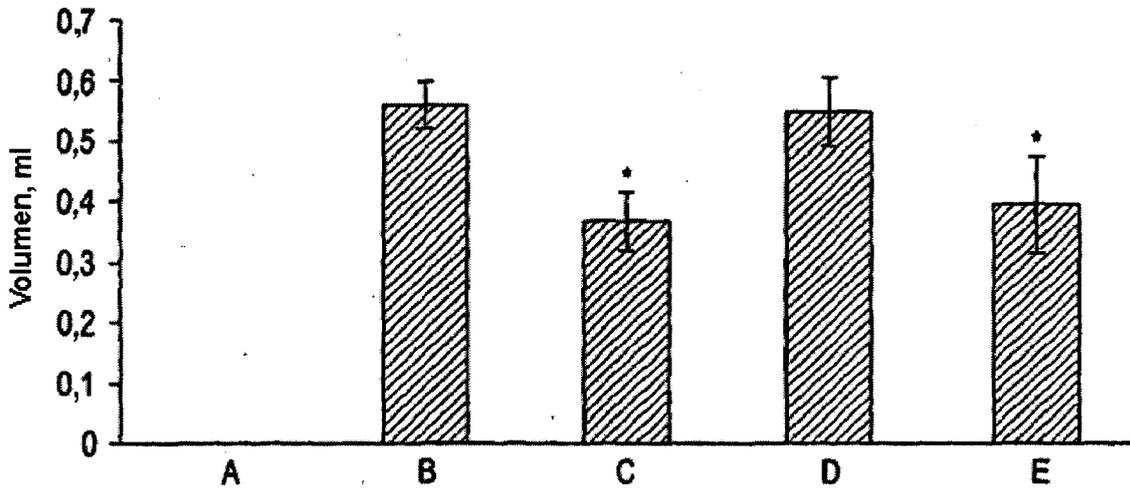


FIG. 15A

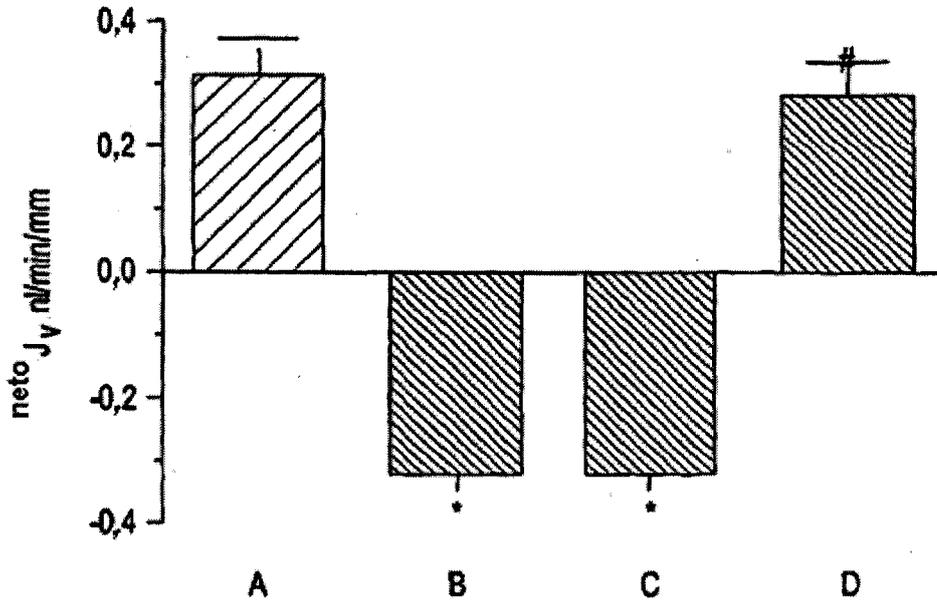


FIG. 15B

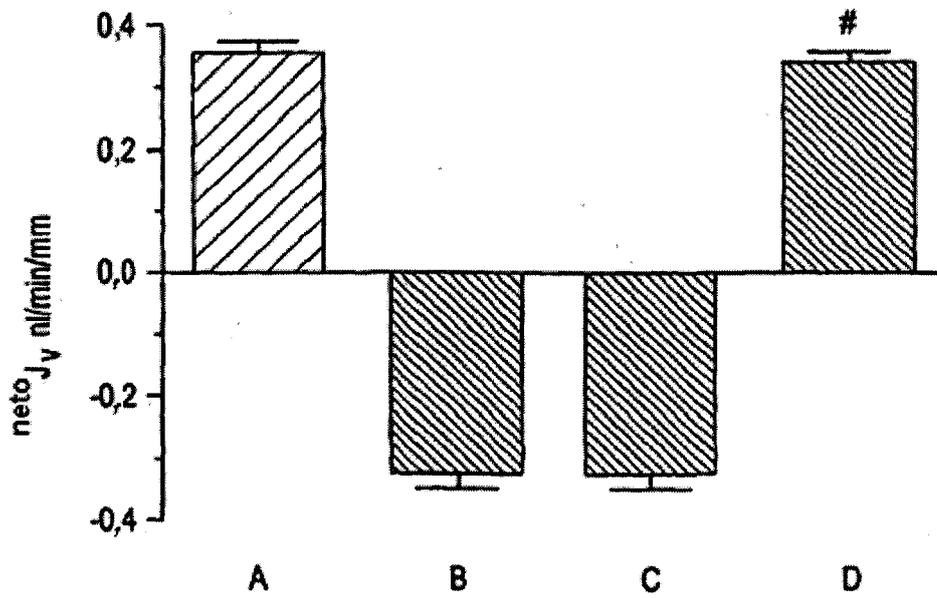


FIG. 16C

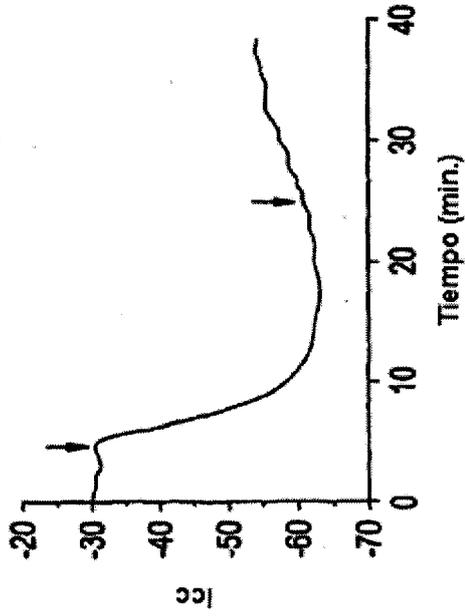


FIG. 16D

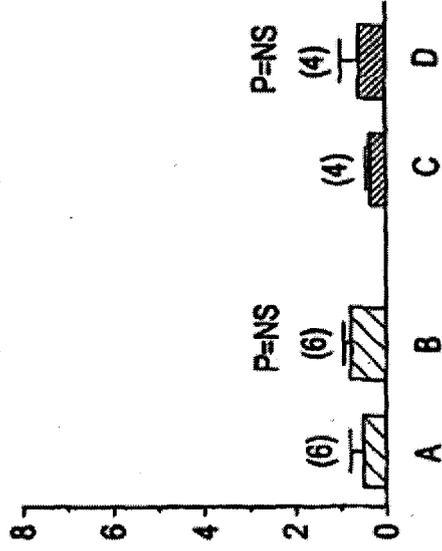


FIG. 16A

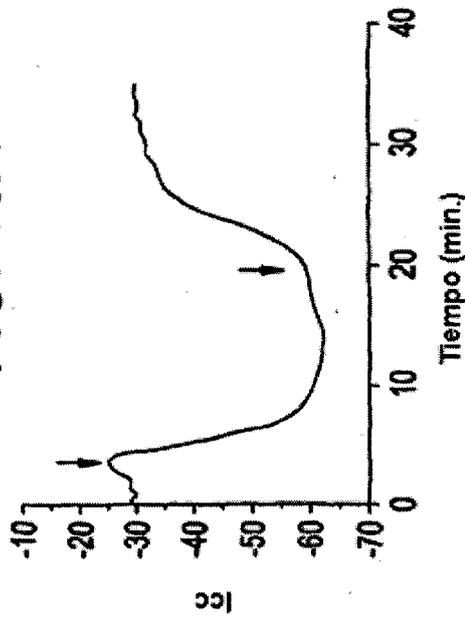


FIG. 16B

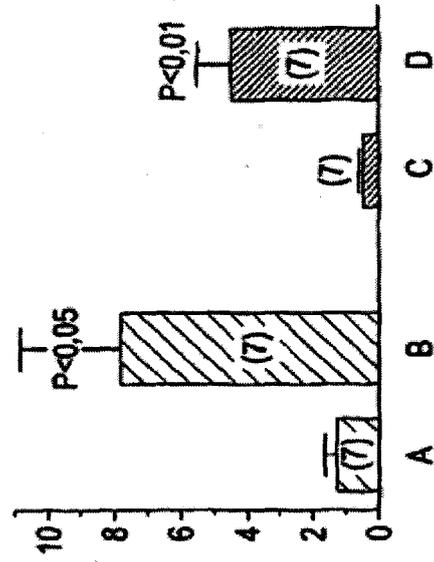


FIG. 17C

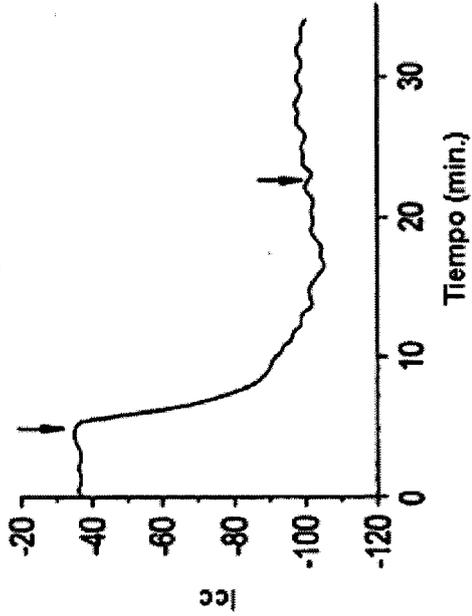


FIG. 17D

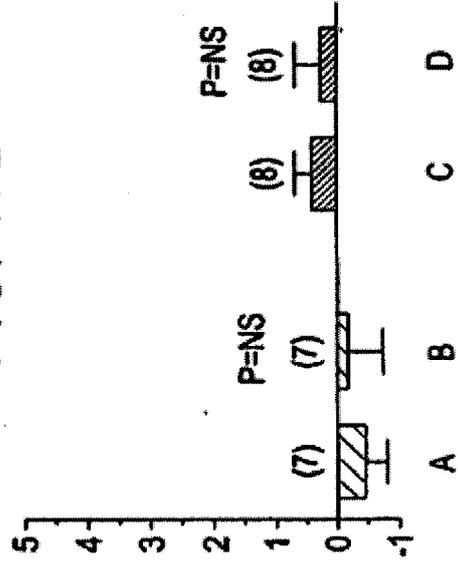


FIG. 17A

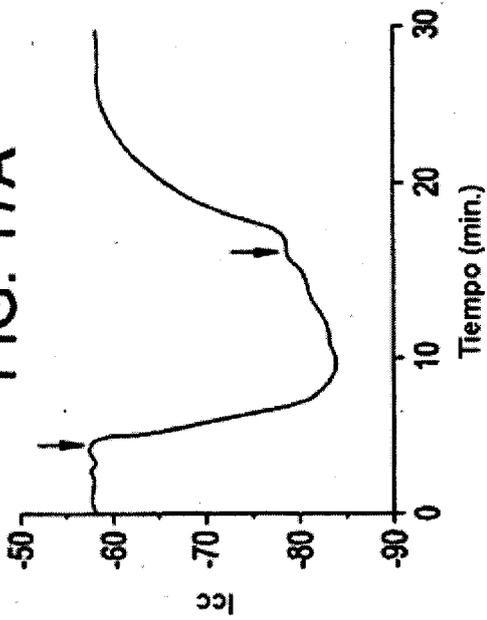


FIG. 17B

