

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 496**

51 Int. Cl.:

A61K 51/00 (2006.01)
A61M 36/14 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2005 E 05762865 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1781339**

54 Título: **Ligandos de guanilato ciclasa C**

30 Prioridad:

25.06.2004 US 583039 P

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

27.03.2014

73 Titular/es:

**THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY (100.0%)
1020 WALNUT STREET
PHILADELPHIA, PA 19107, US**

72 Inventor/es:

**WOLFE, HENRY y
WALDMAN, SCOTT A.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 451 496 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

Ligandos de guanilato ciclasa C

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos y análogos peptídicos que se unen a la proteína receptora celular guanilato ciclasa C (GCC). En algunas realizaciones, los péptidos y análogos peptídicos son agonistas y activan la ruta de señalización que se activa por la unión de los ligandos naturales de GCC a GCC. En algunas realizaciones, los péptidos y análogos peptídicos bloquean la unión de los ligandos naturales de GCC, pero no activan la ruta de señalización activada por la unión de ligandos naturales de GCC a GCC.

Antecedentes de la invención

Las malignidades gastrointestinales, incluyendo adenocarcinoma de esófago, estómago, colon y recto, son una causa destacada de cáncer y mortalidad relacionada con el cáncer en todo el mundo. La GCC es un receptor transmembrana expresado solo en las membranas apicales de enterocitos intestinales en adultos sanos normales y por células tumorales primarias y metastásicas de adenocarcinoma gástrico, esofágico y colorrectal. Conzelmann, M., et al., "Cytokeratin 20 and guanylyl cyclase C mRNA is largely present in lymph node and liver specimens of colorectal cancer patients". *Int. J. Cancer*, 2003. 107(4): pág. 617-28; Cagir, B., et al., "Guanylyl cyclase C messenger RNA is a biomarker for recurrent stage II colorectal cancer". *Ann. Intern. Med.*, 1999. 131(11): pág. 805-12; Bustin, S.A., et al., "Quantification of cytokeratin 20, carcinoembryonic antigen and guanylyl cyclase C mRNA levels in lymph nodes may not predict treatment failure in colorectal cancer patients". *Int. J. Cancer*, 2004. 108(3): pág. 412-7; Pearlman, J.M., et al., "A splice variant of the transcript for guanylyl cyclase C is expressed in human colon and colorectal cancer cells". *Dig. Dis. Sci.*, 2000. 45(2): pág. 298-305; Waldman, S.A., et al., "Use of guanylyl cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colon cancer". *Dis. Colon Rectum*, 1998. 41(3): pág. 310-5; Salto-Téllez, M., et al., "Intrinsic variability in the detection of micrometastases in lymph nodes for restaging of colorectal cancer. Effect of individual markers and tissue samples". *Eur. J. Cancer*, 2003, 39(9): pág. 1234-41; Chen, G., et al., "Detection of occult metastasis in lymph nodes from colorectal cancer patients: a multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction study". *Dis. Colon Rectum*, 2004. 47(5): pág. 679-86; Notarnicola, M., et al., "K-ras and p53 mutations in DNA extracted from colonic epithelial cells exfoliated in faeces of patients with colorectal cancer". *Dig. Liver Dis.*, 2000. 32(2): pág. 131-6; Hugues, M., et al., "Identification and characterization of a new family of high-affinity receptors for Escherichia coli heat-stable enterotoxin in rat intestinal membranes". *Biochemistry*, 1991. 30(44): pág. 10738-45; Carithers, S.L., et al., "Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptors. A novel marker for colorectal tumors". *Dis. Colon Rectum*, 1996. 39(2): pág. 171-81; Carithers, S.L., et al., "Guanylyl cyclase C is a selective marker for metastatic colorectal tumors in human extraintestinal tissues". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(25): pág. 14827-32; Carithers, S.L., et al., "Escherichia coli heat-stable toxin receptors in human colonic tumors". *Gastroenterology*, 1994. 107(6): pág. 1653-61; Bustin, S.A., et al., "Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients". *Br. J. Cancer*, 1999, 79(11-12): pag. 1813-20; Pitari, G.M., et al., "Guanylyl cyclase C agonists regulate progression through the cell cycle of human colon carcinoma cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001. 98(14): pág. 7846-51; Tien, Y.W., et al., "Simultaneous detection of colonic epithelial cells in portal venous and peripheral blood during colorectal cancer surgery". *Dis. Colon Rectum*, 2002, 45(1): pág. 23-9; Park, J., et al., "Ectopic expression of guanylyl cyclase C in adenocarcinomas of the esophagus and stomach". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2002. 11(8): pág. 739-44; Pitari, G.M., et al., "Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100 (5): pág. 2695-9; Vlems, F.A., et al., "Investigations for a multi-marker RT-PCR to improve sensitivity of disseminated tumor cell detection". *Anticancer Res.*, 2003, 23(1A): pag. 179-86; Tien, Y.W., et al., "The role of gelatinase in hepatic metastasis of colorectal cancer". *Clin. Cancer Res.*, 2003. 9(13): pág. 4891-6; Chen, W.S., et al., "Impact of Circulating Free Tumor Cells in the Peripheral Blood of Colorectal Cancer Patients during Laparoscopic Surgery". *World J. Surg.*, 2004 y Tien, Y.W., et al., "Intravasation-Related Metastatic Factors in Colorectal Cancer". *Tumour Biol.*, 2004. 25(1-2): pág. 48-55.

Se ha identificado anteriormente a GCC como un marcador específico y diana para malignidades GI. La identificación de la presencia de GCC en sitios ectópicos, por ejemplo nódulos linfáticos o sangre, puede usarse como marcador par identificar la presencia de micrometástasis ocultas de cánceres esofágico, gástrico, colónico o rectal. Es un método para detectar la presencia de GCC cuantificar la cantidad de unión de un ligando natural de GCC, tal como ST, en los tejidos. También, la GCC parece ser una diana altamente específica a la que pueden dirigirse agentes imagenológicos y terapéuticos novedosos para tratar cánceres esofágico, gástrico, colónico y rectal metastásicos. Es más, los agentes de diagnóstico o imagenológicos pueden orientarse a tumores que expresan GCC mediante su conjugación con ligandos de GCC tales como ST.

La patente de EE.UU. nº 5.518.888, expedida el 21 de mayo de 1996 a Waldman, la solicitud PCT PCT/US94/12232 presentada el 26 de octubre de 1994, la solicitud de EE.UU. de nº de serie 08/467.920 presentada el 6 de junio de 1995 y la solicitud de EE.UU. de nº de serie 08/583.447 presentada el 5 de enero de 1996 dan a conocer que puede orientarse a tumores colorrectales metastasizados el suministro de compuestos activos orientándolos a receptores de ST (también designados como guanilato ciclasa C o GCC). La presencia de receptores de ST en células fuera del

tracto intestinal como marcador de cáncer colorrectal permite el cribado, identificación y tratamiento de individuos con tumores colorrectales metastasizados. Los receptores de ST pueden usarse también para orientar el suministro de terapias génicas y compuestos anticodificantes a células colorrectales.

5 La patente de EE.UU. nº 5.601.990 expedida el 11 de febrero de 1997 a Waldman, la solicitud PCT PCT/US94/12232, presentada el 26 de octubre de 1994 y la solicitud PCT PCT/US97/07467, presentada el 2 de mayo de 1997, dan a conocer que la detección de pruebas de expresión de receptores de ST en muestras de tejido y fluido corporal de fuera del tracto intestinal indica cáncer colorrectal metastasizado.

10 La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos nº 20010029019, publicada el 11 de octubre de 2001, da a conocer que puede orientarse a tumores de cáncer de estómago y esofágico metastasizados el suministro de compuestos activos orientándolos a GCC. La GCC sirve como marcador para cáncer de estómago y esofágico primario y metastasizado y permite el cribado, identificación y tratamiento de individuos con cáncer de estómago y esofágico primario y metastasizado. La GCC se usa también para orientar el suministro de terapias génicas y compuestos anticodificantes a cáncer de estómago y esofágico primario y metastasizado.

La GCC regula el equilibrio de proliferación y diferenciación del epitelio en el intestino. El epitelio intestinal es dinámico, con un eje vertical bien definido que se extiende desde la profundidad de la cripta, en la pared del intestino, hasta las puntas de las vellosidades, que sobresalen en el lumen del intestino. Las células epiteliales "nacen" en el fondo de las criptas como células descendientes producidas por citoblastos intestinales. Estas células descendientes continúan dividiéndose (proliferando) y su progenie migra subiendo por la pared de la cripta hacia la punta de la vellosidad. A lo largo de esta migración, las células pasan de proliferación a diferenciación para volverse enterocitos maduros totalmente funcionales con la capacidad de efectuar las funciones normales del intestino, incluyendo digestión, absorción y secreción. Una vez en la punta, estas células se desprenden al lumen del intestino y mueren. Por tanto, el epitelio intestinal se renueva cada tres días. La GCC y sus ligandos endógenos parecen ser uno de los factores que pasa las células epiteliales de proliferación a diferenciación a lo largo del eje cripta-vellosidad. Es más, los ligandos de GCC inhiben la proliferación de estas células y cambian su patrón de expresión génica a un estado más diferenciado terminalmente.

30 La proteína GCC no se ha detectado en ningún tejido no canceroso fuera del intestino y se encuentra solo en tumores de origen gastrointestinal. Es de particular importancia para esta propuesta que no se ha reseñado la detección de ARNm de GCC en ningún tejido metastásico de cáncer colorrectal, concretamente tejido no colorrectal donde se detecta a menudo cáncer colorrectal metastásico. Para individuos normales, no se ha descrito la presencia de ARNm de GCC en la bibliografía publicada para sitios metastáticos de cáncer colorrectal, gástrico o esofágico (concretamente, hígado, pulmón, hueso, cerebro), pero se ha descrito en las células de túbulo proximal de riñón (Sindice, A., et al., "Guanylin, uroguanylin, and heat-stable enterotoxin activate guanylate cyclase C and/or a pertussis toxin-sensitive G protein in human proximal tubule cells". J. Biol. Chem., 2002. 277 (20): pág. 17758-64), en células del conducto exocrino del páncreas (Kulaksiz, H., et al., "Guanylin in the human pancreas: a novel luminocrine regulatory pathway of electrolyte secretion via cGMP and CFTR in the ductal system". Histochem. Cell. Biol., 2001. 115(2): pág. 131-45), glándulas submandibulares (Kulaksiz, H., et al., "Guanylin and functional coupling proteins in the human salivary glands and gland tumors : expression, cellular localization, and target membrane domains". Am. J. Pathol., 2002. 161(2): pág. 655-64), conducto biliar (Kulaksiz, H., et al., "Guanylin regulates chloride secretion in the human gallbladder via the bile fluid". Gastroenterology, 2004. 126(3): pág. 732-40) y a niveles de traza en citoblastos CD34+ (Fava, T.A., et al., "Ectopic expression of guanylyl cyclase C in CD34+ progenitor cells in peripheral blood". J. Clin. Oncol., 2001. 19(19): pág. 3951-9). Es un motivo común de cada una de estas localizaciones anatómicas, excepto las células CD34+, que la GCC está separada de los sistemas sanguíneo y linfático por uniones estrechas análogas a las encontradas en el intestino.

Las enfermedades diarreicas son la cuarta causa principal de mortalidad en el mundo, responsables de aproximadamente 20 millones de muertes cada año. Dichas enfermedades son la causa principal de mortalidad pediátrica en el mundo, afectando particularmente a niños de menos de 5 años de edad. Además, las enfermedades diarreicas son responsables de ~25 % del retraso de crecimiento observado en niños criados en naciones subdesarrolladas, en comparación con desarrolladas. Son una causa importante de enfermedad diarreica los organismos productores de enterotoxinas termoestables (ST), una familia de péptidos estructuralmente relacionados producidos por diferentes organismos incluyendo, pero sin limitación, E. coli, Yersinia, Enterobacter y Vibrio. Esta familia de péptidos de ST estructuralmente relacionados es homóloga de los péptidos endógenos guanílica y uroguanílica producidos por intestino de mamífero. Los organismos productores de ST son una causa importante de diarrea endémica en países subdesarrollados, la causa principal de diarrea del viajero y la causa principal de enfermedad diarreica en poblaciones animales importantes desde el punto de vista agrícola (diarrea del ganado) en países desarrollados y subdesarrollados. Se estiman unos números de incidencia anual de enfermedad diarreica inducida por ST de miles de millones en animales y seres humanos. La ST induce diarrea al unirse a GCC, que se expresa selectivamente en membranas del borde en cepillo de células epiteliales intestinales y es el presunto receptor de los ligandos guanílica y uroguanílica. La interacción de ST, o los ligandos endógenos guanílica y uroguanílica, con GCC activa ese receptor, dando como resultado la producción de GMP cíclico intracelular. El GMP cíclico, a través de una cascada de señalización, induce la secreción de sal y agua al lumen del intestino, dando como resultado diarrea. Se ha sugerido que es una función de los ligandos endógenos guanílica y uroguanílica en la

fisiología normal la regulación de la homeostasis de fluidos y electrolitos en el intestino, y la hidratación de los contenidos intestinales (por ejemplo, heces).

Durante los últimos 20 a 30 años, se han hecho intentos de diseñar ligandos que antagonicen GCC. Dicho compuesto de la invención sería útil en la detección de GCC en células, como agente de diagnóstico y terapéutico orientado en casos de malignidades GI y en el tratamiento de enfermedades diarreicas de animales y seres humanos. Además, dicho compuesto de la invención podría tener aplicación en casos que requieran adaptación intestinal, en los que el epitelio requiere una regeneración rápida después de un ataque, por ejemplo daño químico o isquémico. Los estudios de estructura-función previos de ligandos de GCC no eran reveladores con respecto a la discriminación de los determinantes estructurales requeridos para la unión a receptor de aquellos requeridos para la activación de agonista (por ejemplo, producción de GMP cíclico).

Gariépy, J. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84: 8907-8911 discute la importancia de los puentes disulfuro en la estructura y actividad de la enterotoxina ST1b de Escherichia coli.

Hidaka, Y., et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991, 176(3): 958-965 discute la síntesis y propiedades biológicas de análogos de carba de enterotoxina termoestable (ST) producidos por Escherichia coli enterotoxigénica.

Shailubhai, K., Current Opinion in Drug Discovery & Development, 2002, 5(2): 261-268 discute aplicaciones terapéuticas de agonistas del receptor guanilato ciclasa C.

Gali, H., et al., Nuclear Medicine and Biology, 2001, 28:903-909 se refiere a la evaluación in vivo de un análogo peptídico de ST marcado con ¹¹¹In para orientación específica a cánceres de colon humanos.

Yamasaki, S., et al., The Chemical Society of Japan, 1988, 61:1701-1706 discute los requisitos estructurales para la estructura espacial y toxicidad de enterotoxina termoestable (ST_n) de Escherichia coli enterotoxigénica.

Carpick, B.W., et al., Biochemistry, 1991, 30: 4803-4809 discute la caracterización estructural de regiones funcionalmente importantes de la enterotoxina termoestable ST1b de Escherichia coli.

Existe la necesidad de compuestos que se unan a GCC y activen la ruta de señalización de GCC y existe la necesidad de compuestos que se unan a GCC pero no activen la ruta de señalización de GCC.

Sumario de la invención

El objeto en cuestión para el que se persigue la protección es como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona compuestos que se unen a GCC. Los ligandos endógenos de GCC y enterotoxinas conocidas por unirse a GCC se caracterizan por tener dos enlaces disulfuro (que forman el bucle B y el bucle C) o tres enlaces disulfuro (que forman el bucle A, bucle B y bucle C). Los compuestos de la invención tienen la estructura de fórmula (III):

(III) R301 - R302 - R303 - R304 - R305 - R306 - R307- R308 - R309

en la que:

R301 está ausente o se selecciona del grupo consistente en: 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos y combinaciones de los mismos;

R302 es C entrecruzada con C de R306;

R303 es C entrecruzada con C de R308;

R304 es E-L; en el que R304 forma un grupo de giro de hélice ₃₁₀ que liga R303 con R305;

R305 se selecciona del grupo consistente en: L, T, F, V, I, Y, N-metil-Leu, N-metil-Ala o N-metil-Val, en el que

R305 no se entrecruza con R309;

R306 es C entrecruzada con C de R302;

R307 es N-P-A, en el que R307 forma un grupo de giro beta que liga R306 con R308;

R308 es C entrecruzada con C de R303; y

R309 está ausente o se selecciona del grupo consistente en: 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos y combinaciones de los mismos;

en la que R309 no se entrecruza con R305.

Los compuestos de la divulgación tienen un bucle A o bucle B, pero no ambos. Los compuestos de la invención pueden conjugarse con agentes activos tales como marcajes detectables, agentes imagenológicos o compuestos terapéuticos y usarse para unirse a GCC, que es un marcador de cáncer para cáncer colorrectal metastasizado y para cáncer esofágico y de estómago primario y metastasizado.

Algunos compuestos de la divulgación que tienen el bucle A son compuestos de GCC de la divulgación. Se unen a GCC pero no activan la ruta de GCC. Estos son útiles para tratar una activación indeseable de la ruta de GCC tal como la asociada a diarrea, tal como diarrea del viajero causada por exposición a enterotoxinas bacterianas. Algunos aspectos de la presente divulgación se refieren a estos compuestos y a métodos para usarlos.

Algunos compuestos de la invención que tienen el bucle B son compuestos de GCC de la invención, algunos son agonistas de GCC y algunos son profármacos de GCC, que son compuestos de GCC de la invención pero que cuando se procesan in vivo se convierten en agonistas. Algunos compuestos que tienen el bucle B son compuestos de GCC de la invención, se unen a GCC pero no activan la ruta de GCC. Son útiles para tratar la activación indeseable de la ruta de GCC tal como la asociada a diarrea, tal como diarrea del viajero causada por exposición a enterotoxinas bacterianas. Algunos aspectos de la presente invención se refieren a estos compuestos y a métodos para usarlos.

Algunos compuestos que tienen el bucle B son agonistas de GCC, se unen a GCC y activan la ruta de GCC. Son útiles para tratar cáncer, particularmente cáncer colorrectal metastasizado y cáncer esofágico y de estómago primario y metastasizado, así como para prevenir la metástasis y activar la ruta de GCC para inducir la defecación, tal como cuando un individuo está estreñido o con impactación. Algunos aspectos de la presente invención se refieren a estos compuestos y a métodos para usarlos.

Algunos compuestos que tienen el bucle B son profármacos de GCC. Estos compuestos se unen a GCC pero no activan la ruta de GCC cuando están intactos. Cuando se procesan estos compuestos, tal como cuando se procesan in vivo por enzimas endógenas o administradas que degradan sus residuos C-terminales, se vuelven agonistas de GCC. Estos compuestos son útiles para tratar cáncer, particularmente cáncer colorrectal metastasizado y cáncer esofágico y de estómago primario y metastasizado, así como para prevenir la metástasis y activar la ruta de GCC para inducir la defecación, tal como cuando un individuo está estreñido o con impactación. Tienen la ventaja de tener una actividad retardada y una conversión controlable usando inhibidores enzimáticos para prevenir la degradación. Cuando se usan junto con inhibidores enzimáticos que previenen la degradación, puede controlarse o evitarse su conversión, con lo que actúan como el compuesto de la invención lo que los hace útiles para inhibir la activación de GCC.

La presente divulgación se refiere a compuestos que tienen una estructura según la fórmula (I)

(I) R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R6 - R7

en la que:

R1 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R2 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido;

R3 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R8;

R4 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que

R4 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R3 con R5;

R5 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con R9;

R6 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido;

R7 es uno, dos o tres aminoácidos naturales, uno, dos o tres aminoácidos bloqueados, uno, dos o tres miméticos de aminoácidos o un mimético de tripéptido o combinaciones de los mismos, en el que R7 forma un grupo de giro beta que liga R6 con R8;

R8 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R3;

R9 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos, que no se entrecruza con R5, a condición de que la estructura no sea:

C-hC-E-L-A-C-N-P-A-X; hC;

C-E-L-A-X-N-P-A-C;

C-C-E-L-A-C-N-P-A-C;

C-C-E-L-A-C-N-P-A-C-T-G-A;

Y-Ca-C-E-L-F-Ca-N-P-A-C;

Y-C-C-E-L-mA-C-N-P-A-C;

Y-C-C-E-mL-A-C-N-P-A-C;

C-C-E-L-Cm-C-N-P-A-C-A-G-Cm;

C-C-E-L-Ca-C-N-P-A-C-A-G-Ca; o

X-Ca-E-L-A-hC-N-P-A-Ca;

en las que:

hC es homocisteína;

X es alanina ligada con hC a través de un enlace CH₂S covalente entre una cadena lateral de Ala y una cadena lateral de hC;

Cm es (S-metoxibencil)cisteína; y

Ca es (S-acetamidometil)cisteína.

La presente divulgación se refiere también a compuestos que son compuestos de bucle A de la divulgación. La presente divulgación se refiere a compuestos que tienen la fórmula (II):

(II) R201 - R202 - R203 - R204 - R205 - R206 - R207

en la que:

R201 está ausente o es 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R202 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido; o es un aminoácido

natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R205 o R206, en el que si R202 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, entonces R203 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R205 o R206;

R203 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, o si R202 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, entonces R203 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R205 o R206;

R204 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que R204 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R203 con R205;

R205 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, o si R206 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, entonces R205 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R202 o R203;

R206 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R202 o R203, en el que si R206 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, entonces R205 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R202 o R203; y

R207 está ausente o es 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos.

La presente invención se refiere también a compuestos que son compuestos de bucle B. La presente invención se refiere a compuestos que tienen la fórmula (III):

(III) R301 - R302 - R303 - R304 - R305 - R306 - R307- R308 - R309

en la que:

R301 está ausente o se selecciona del grupo consistente en: 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R302 es C entrecruzada con C de R306;

R303 es C entrecruzada con C de R308;

R304 es E-L; en el que R304 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R303 con R305;

R305 se selecciona del grupo consistente en: L, T, F, V, I, Y, N-metil-Leu, N-metil-Ala o N-metil-Val, en el que

R305 no se entrecruza con R309;

R306 es C entrecruzada con C de R302;

R307 es N-P-A, en el que R307 forma un grupo de giro beta que liga R306 con R308;

R308 es C entrecruzada con C de R303; y

R309 está ausente o se selecciona del grupo consistente en: 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos y combinaciones de los mismos;

en la que R309 no se entrecruza con R305.

La presente divulgación se refiere adicionalmente a compuestos que tienen la fórmula (IV):

(IV) R401- R402 - R403 - R404 - R405 - R406 - R407- R408 - R409

en la que:

R401 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R402 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido en el que R402 puede entrecruzarse con R406;

R403 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R408;

R404 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que

R404 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R403 con R405;

R405 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con R409;

R406 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido, en el que R406 puede entrecruzarse con R402;

R407 es uno, dos o tres aminoácidos naturales, uno, dos o tres aminoácidos bloqueados, uno, dos o tres miméticos de aminoácidos o un mimético de tripéptido o combinaciones de los mismos, en el que R407 forma un giro beta que liga R406 con R408;

R408 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R403;

R409 está ausente;

en la que la estructura del compuesto no es:

C-hC-E-L-A-C-N-P-A-X-hC

C-E-L-A-X-N-P-A-C;

C-C-E-L-A-C-N-P-A-C;

Y-Ca-C-E-L-F-Ca-N-P-A-C;

Y-C-C-E-L-mA-C-N-P-A-C;

Y-C-C-E-mL-A-C-N-P=A-C;

C-C-E-L-Cm-C-N-P-A-C-A-G-Cm;

C-C-E-L-Ca-C-N-P-A-C-A-G-Ca; o

X-Ca-E-L-A-hC-N-P-A-Ca;

en las que:

hC es homocisteína;

X es alanina ligada con hC a través de un enlace CH₂S covalente entre una cadena lateral de Ala y una cadena lateral de hC;

Cm es (S-metoxibencilo)cisteína y

Ca es (S-acetamidometil)cisteína.

La presente divulgación se refiere también a compuestos que son profármacos de bucle B. La presente invención se refiere a compuestos que tienen la fórmula (V):

(V) R501 - R502 - R503 - R504 - R505 - R506 - R507- R508 - R509

en la que:

R501 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R502 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido en el que R502 puede entrecruzarse con R506;

R503 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R508;

R504 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que

R504 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R503 con R505;

R505 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con R509;

R506 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido, en el que R506 puede entrecruzarse con R502;

R507 es uno, dos o tres aminoácidos naturales, uno, dos o tres aminoácidos bloqueados, uno, dos o tres miméticos de aminoácidos o un mimético de tripéptido o combinaciones de los mismos, en el que R507 forma un giro beta que liga R506 con R508;

R508 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R503;

R509 es 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos que no se entrecruza con R505;

en la que el compuesto es degradable in vivo y la estructura de los compuestos no es C-C-E-L-A-C-N-P-A-C-T-G-A.

La presente divulgación se refiere también a compuestos que son compuestos de bucle B de la invención. La presente invención se refiere a compuestos que tienen la fórmula (VI):

(VI) R601 - R602 - R603 - R604 - R605 - R606 - R607- R608 - R609

en la que:

R601 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R602 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido en el que R602 puede entrecruzarse con R606;

R603 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R608;

R604 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que

R604 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R603 con R605;

R605 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con R609;

R606 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido, en el que R606 puede entrecruzarse con R602;

R607 es uno, dos o tres aminoácidos naturales, uno, dos o tres aminoácidos bloqueados, uno, dos o tres miméticos de aminoácidos o un mimético de tripéptido o combinaciones de los mismos, en el que R607 forma un giro beta que liga R606 con R608;

R608 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R603;

R609 es 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos que no se entrecruza con R605; y no son degradables in vivo.

La presente invención se refiere adicionalmente a compuestos conjugados que comprenden un compuesto de fórmula (III) que se conjuga con un resto activo que puede ser un radionucleido, una enzima, un marcaje fluorescente, un grupo quelante de metal, un marcaje quimioluminiscente, un marcaje bioluminiscente, un producto quimioterapéutico, una toxina, un profármaco inactivo, un agente radiosensibilizador, un agente fotodinámico, una molécula de ácido nucleico o combinaciones de los mismos.

La presente invención se refiere adicionalmente a composiciones que comprenden liposomas que comprenden compuestos de la invención, conjugados o no conjugados, en combinación con un agente activo seleccionado del grupo consistente en: un radionucleido, una enzima, un marcaje fluorescente, un grupo quelante de metal, un marcaje quimioluminiscente, un marcaje bioluminiscente, un producto quimioterapéutico, una toxina, un profármaco inactivo, un agente radiosensibilizador, un agente fotodinámico, una molécula de ácido nucleico o combinaciones de los mismos.

La presente invención se refiere adicionalmente a composiciones que comprenden compuestos de la invención en combinación con un producto quimioterapéutico, una toxina o combinaciones de los mismos.

La presente invención se refiere a métodos de diagnóstico de cáncer caracterizado por la expresión de GCC en un individuo. Los métodos comprenden la etapa de detectar GCC en una muestra extraintestinal de un individuo poniendo en contacto la muestra o porciones de la misma con dicho compuesto y detectando la presencia del compuesto unido a la muestra.

La presente invención se refiere a métodos de imagenología del cáncer caracterizados por la expresión de GCC en un individuo. Los métodos comprenden la etapa de administrar al individuo dicho compuesto conjugado en que el resto activo del compuesto conjugado es un marcaje detectable. Se detecta la acumulación del compuesto conjugado en un sitio del cuerpo del individuo.

La presente invención se refiere adicionalmente a compuestos de la invención para uso en métodos de tratamiento de cáncer caracterizado por la expresión de GCC en un individuo. Los métodos comprenden la etapa de administrar al individuo dicho compuesto conjugado en que el resto activo inactiva o inhibe la replicación de las células a la que se une.

La presente invención se refiere adicionalmente a compuestos de la invención para uso en métodos de tratamiento de un individuo que tiene diarrea mediada por enterotoxina o que está en riesgo de contraer diarrea mediada por enterotoxina. Los métodos comprenden la etapa de administrar a dicho individuo un compuesto con una estructura según la fórmula (III) en condiciones tales que el extremo C-terminal no sea degradable de modo que el compuesto se convierta en un agonista.

La presente invención se refiere adicionalmente a compuestos de la invención para uso en métodos de tratamiento de un individuo que tiene cáncer o que tiene riesgo de desarrollar cáncer. Los métodos comprenden la etapa de administrar a dicho individuo un compuesto con una estructura según la fórmula (III) en condiciones tales que el extremo C sea degradable, de tal modo que el compuesto se convierta en un agonista. En algunas realizaciones, los compuestos se administran en combinación con un agente quimioterapéutico o una toxina.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra datos: efecto de la hidrofobicidad en el residuo 9;

figura 2: compuestos principales de la invención (comparando ST(4-14)Phe9,Cys(Mob)5,10Mono, ST(4-14)NMeLeu8 y ST(4-14)NMeAla9 a 1 y 25 μ M con y sin ST);

figura 3: compuestos principales de GCC de la invención (comparando ST(4-14)Phe9,Cys(Mob)5,10Mono, ST(4-14)NMeLeu8, ST(4-14)NMeAla9 y ST(4-14)Ala9,17 a 1 y 25 μ M);

figura 4: cribado de los compuestos de GCC de la invención (comparando 16 compuestos diferentes de la invención a 1 μ M);

figura 5: tabla que contiene los datos brutos de 16 compuestos diferentes de la invención a 1 μ M y 25 μ M;

figura 6: efecto del residuo 9 sobre la eficacia de antagonista de ST.

Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

Definiciones:

Como se usan en la presente memoria, los siguientes términos tendrán los siguientes significados:

Como se usa en la presente memoria, con los términos “antagonista”, “compuestos antagonistas” y “antagonistas de la invención”, se pretende hacer referencia a compuestos que se unen a GCC y bloquean la unión a GCC de ligandos naturales pero no activan la ruta de GCC.

Como se usa en la presente memoria, con los términos “agonista”, “compuestos agonistas” y “agonistas de la invención”, se pretende hacer referencia a compuestos que se unen a GCC y bloquean la unión a GCC de ligandos naturales y activan la ruta de GCC.

Como se usa en la presente memoria, el término “ligandos naturales” pretende hacer referencia a enterotoxinas termoestables así como a los ligandos de GCC producidos endógenamente guanilina y uroguanilina.

Como se usa en la presente memoria, el término “agente activo” hacer referencia a compuestos que son agentes terapéuticos o agentes imagenológicos.

Como se usa en la presente memoria, el término “agente terapéutico” pretende hacer referencia a productos quimioterapéuticos, toxinas, productos radioterapéuticos, agentes orientadores o agentes radiosensibilizadores.

Como se usa en la presente memoria, el término “agente quimioterapéutico” pretende hacer referencia a compuestos que, cuando se ponen en contacto con y/o se incorporan a una célula, producen un efecto en la célula, incluyendo causar la muerte de la célula, inhibir la división celular o inducir la diferenciación.

Como se usa en la presente memoria, el término toxina pretende hacer referencia a compuestos que, cuando se ponen en contacto y/o se incorporan a una célula, producen la muerte de la célula.

Como se usa en la presente memoria, el término “producto radioterapéutico” pretende hacer referencia a radionucleidos que, cuando se ponen en contacto con y/o se incorporan a una célula, producen la muerte de la célula. Como se usa en la presente memoria, “agente orientador” pretende hacer referencia a compuestos que pueden unirse a y/o reaccionar con otros compuestos. Los agentes orientadores pueden usarse para suministrar productos quimioterapéuticos, toxinas, enzimas, productos radioterapéuticos, anticuerpos o agentes imagenológicos a células que tienen agentes orientadores asociados a las mismas y/o para convertir o transformar de otro modo o potenciar los agentes activos coadministrados. Un agente orientador puede incluir un resto que constituye un primer agente que se localiza en la célula, que cuando se pone en contacto con segundo agente, se convierte en un tercer agente que tiene la actividad deseada o causa la conversión del segundo agente en un agente con la actividad deseada. El resultado es que el agente localizado facilita la exposición de un agente con la actividad deseada a la célula cancerosa.

Como se usa en la presente memoria, el término “agente radiosensibilizador” pretende hacer referencia a agentes que aumentan la susceptibilidad de células ante los efectos dañinos de la radiación ionizante. Un agente radiosensibilizador permite administrar dosis menores de radiación y seguir proporcionando una dosis terapéuticamente eficaz.

Como se usa en la presente memoria, el término “agente imagenológico” pretende hacer referencia a compuestos que pueden detectarse.

Como se usa en la presente memoria, el término “resto activo” pretende hacer referencia a la porción de un compuesto conjugado que constituye un agente activo.

Como se usa en la presente memoria, los términos “compuesto conjugado” y “composición conjugada” se usan intercambiamente para hacer referencia a un compuesto que comprende un compuesto de la invención como resto de unión a GCC y un resto activo. El compuesto conjugado es aquel capaz de unirse a CGG. Los compuestos conjugados según la presente invención comprenden una porción que constituye el compuesto de la invención y una porción que constituye un agente activo. Por tanto, los compuestos conjugados según la presente invención son capaces de unirse específicamente a GCC e incluyen una porción que es un agente terapéutico o agente imagenológico. Las composiciones conjugadas pueden comprender ligadores y/o moléculas que sirven como espaciadores entre restos.

Como se usan en la presente memoria, los términos “ligador”, “agente ligador”, “agente de conjugación”, “agente de acoplamiento”, “reactivo de condensación” y “ligador bifuncional” se usan intercambiamente y se pretende que hagan referencia a grupos moleculares que se usan para enlazar el compuesto de la invención y los agentes activos, formando por tanto el compuesto conjugado.

Como se usa en la presente memoria, el término “cáncer colorrectal” se pretende que incluya la definición médica bien aceptada que define cáncer colorrectal como una afección médica caracterizada por cáncer de células del tracto intestinal por debajo del intestino delgado (concretamente, el intestino grueso (colon), incluyendo ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, colon sigmoide y recto). Adicionalmente, como se usa en la presente memoria, el término “cáncer colorrectal” se pretende que incluya adicionalmente afecciones médicas que se caracterizan por cáncer de células de duodeno e intestino delgado (yeyuno e íleon). La definición de cáncer colorrectal usada en la presente memoria es más amplia que la definición médica común, pero se proporciona como tal puesto que las células de duodeno e intestino delgado contienen también GCC.

Como se usa en la presente memoria, el término “cáncer de estómago” pretende incluir la definición médica bien aceptada que define cáncer de estómago como una afección médica caracterizada por cáncer de células del estómago.

Como se usa en la presente memoria, el término “cáncer esofágico” pretende incluir la definición médica bien aceptada que define cáncer esofágico como una afección médica caracterizada por cáncer de células del esófago.

Como se usa en la presente memoria, el término “metástasis” pretende hacer referencia al proceso en que las células cancerosas originadas en un órgano o parte del cuerpo se desplazan a otra parte del cuerpo y continúan replicándose. Las células metastasizadas forman posteriormente tumores que pueden metastasizar adicionalmente. La metástasis hace referencia por tanto a la difusión del cáncer desde la parte del cuerpo donde aparece originalmente a otras partes del cuerpo.

Como se usa en la presente memoria, el término “células de cáncer colorrectal metastasizadas” pretende hacer referencia a células de cáncer colorrectal que han metastasizado. Células de cáncer colorrectal metastasizadas localizadas en una parte del cuerpo distinta de duodeno, intestino delgado (yeyuno e íleon), intestino grueso (colon) incluyendo ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y colon sigmoide, y recto.

Como se usa en la presente memoria, el término “células de cáncer de estómago metastasizadas” pretende hacer referencia a células de cáncer de estómago que han metastasizado. Células de cáncer de estómago metastasizadas localizadas en una parte del cuerpo distinta del estómago.

Como se usa en la presente memoria, el término “células de cáncer esofágico metastasizadas” pretende hacer referencia a células de cáncer colorrectal que han metastasizado. Células de cáncer esofágico metastasizadas localizadas en una parte del cuerpo distinta del esófago.

Como se usa en la presente memoria, el término “muestra no colorrectal” y “muestra extraintestinal” se usan intercambiamente y pretenden hacer referencia a una muestra de tejido o fluido corporal distinta de un tejido colorrectal. En algunas realizaciones preferidas, la muestra no colorrectal es una muestra de tejido tal como nódulos linfáticos. En algunas realizaciones preferidas, la muestra no colorrectal es una muestra de tejido extraintestinal que es un adenocarcinoma de origen no confirmado. En algunas realizaciones preferidas, la muestra no colorrectal es una muestra de sangre.

Como se usa en la presente memoria, “un individuo que padece un adenocarcinoma de origen no confirmado” pretende hacer referencia a un individuo que tiene un tumor cuyo origen no se ha identificado definitivamente.

5 Como se usa en la presente memoria, “un individuo sospechoso de tener tendencia a cáncer colorrectal, de estómago o esofágico” pretende hacer referencia a un individuo que tiene un riesgo particular de desarrollar cáncer colorrectal, de estómago o esofágico. Los ejemplos de individuos con riesgo particular de desarrollar cáncer colorrectal, de estómago o esofágico son aquellos cuyo historial médico familiar indica una incidencia superior a la media de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico entre los miembros de la familia y/o aquellos que ya han desarrollado cáncer colorrectal, de estómago o esofágico y se han tratado eficazmente, y que por lo tanto se enfrentan al riesgo de recaída y recurrencia.

10 Como se usa en la presente memoria, el término “cáncer caracterizado por la expresión de GCC” pretende hacer referencia a un cáncer en el que las células cancerosas expresan GCC. Las células colorrectales expresan normalmente GCC y continúan haciéndolo después de transformación de normales en malignas. En consecuencia, la GCC es un marcador eficaz para identificar y orientar a cáncer colorrectal metastasizado. Igualmente, se ha encontrado ARNm de GCC en células de túbulo proximal de riñón, células de conductor exocrino de páncreas, glándulas submandibulares y células de conducto biliar, sugiriendo que la GCC puede expresarse por estas células. Las células esofágicas y de estómago normalmente no expresan GCC, pero cuando desarrollan cáncer, empieza a expresarse GCC. En consecuencia, la detección de GCC en localizaciones distintas de las localizaciones en que la GCC se expresa normalmente sugiere cáncer.

15 Como se usa en la presente memoria, los términos “composición anticodificante” y “moléculas anticodificantes” se usan intercambiamente y pretenden hacer referencia a compuestos que regulan la transcripción o traducción hibridando con ADN o ARN e inhibiendo y/o evitando que tenga lugar la transcripción o traducción. Las moléculas anticodificantes incluyen moléculas de ácido nucleico y derivados y análogos de la mismas. Las moléculas anticodificantes hibridan con ADN o ARN de la misma manera que lo hacen las secuencias nucleotídicas complementarias independientemente de si la molécula anticodificante es una molécula de ácido nucleico o un derivado o análogo. Las moléculas anticodificantes pueden inhibir o evitar la transcripción o traducción de genes cuya expresión está ligada al cáncer.

20 A menos que se indique otra cosa, todas las formas quirales, diastereoméricas y racémicas están incluidas en la presente invención. Pueden estar presentes también en los compuestos descritos en la presente memoria muchos isómeros geométricos de olefinas, dobles enlaces C=N y similares, y todos dichos isómeros estables están contemplados en la presente invención. Se apreciará que los compuestos de la presente invención pueden contener átomos de carbono sustituidos asimétricamente, y pueden aislarse en formas ópticamente activa o racémica. Es bien conocido en la materia cómo preparar formas ópticamente activas, tal como mediante resolución de formas racémicas o mediante síntesis, a partir de materiales de partida ópticamente activos. Se pretenden todas las formas quirales, diastereoméricas, racémicas y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a menos que se indique específicamente la estereoquímica o forma isomérica específica.

25 Como se usa en la presente memoria, el término “aminoácidos de origen natural” significa los isómeros L de los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, metionina, treonina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, prolina, histidina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, ácido carboxiglutámico, arginina, ornitina y lisina. A menos que se indique específicamente, todos los aminoácidos a los que se hace referencia en esta solicitud están en forma L.

30 Como se usa en la presente memoria, el término “cadena lateral de un aminoácido de origen natural” hace referencia al sustituyente en el carbono α de un aminoácido α . El término “cadena lateral polar de un aminoácido de origen natural” hace referencia a la cadena lateral de un aminoácido cargado positivamente, cargado negativamente o hidrófilo. El término “cadena lateral no polar de un aminoácido de origen natural” hace referencia a la cadena lateral de un aminoácido hidrófobo. Las cadenas laterales pueden seleccionarse independientemente de, y terminarse independientemente con, los grupos reactivos: H, alquilo C1-C10, alquenilo C2-C6, cicloalquilo C3-C11, cicloalquilalquilo C4-C11, arilo C6-C10, arilalquilo C7-C11, alquil C2-C7-carbonilo, aril C6-C10-carbonilo, alcoxi C2-C10-carbonilo, cicloalcoxi C4-C11-carbonilo, bicicloalcoxi C7-C11-carbonilo, aril C6-C10-oxicarbonilo, arilalcoxi C1-C10-carbonilo, alquil C1-C6-carboniloxialcoxi C1-C4-carbonilo, aril C6-C10-carboniloxialcoxi C1-C4-carbonilo, cicloalquil C4-C11-carboniloxialcoxi C1-C4-carbonilo, -piridil- -piridazinil- -piperidinil-, (1,3-dioxaciclopenten-2-onil)metiloxilo, C10 a C14, (5-aril-1,3-dioxaciclopenten-2-onil)metiloxilo, (R),(R)-N-(alcoxi C1-C10)-, cicloalquilo C3 a C11, cicloalquil C4 a C11-metilo, alcoxi C1-C6, benciloxilo, arilo C6 a C10, heteroarilo o heteroarilalquilo, arilalquilo C7 a C11, adamantilmetilo o alquilo C1-C10, azabíciclononilo, 1-piperidinilo, 1-morfolinilo o 1-piperazinilo, estando cada uno opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6, arilo C6-C10, heteroarilo, arilalquilo C7-C11, alquil C1-C6-carbonilo, cicloalquil C3-C7-carbonilo, alcoxi C1-C6-carbonilo, arilalcoxi C7-C11-carbonilo, alquil C1-C6-sulfonilo o aril C6-C10-sulfonilo.

35 Como se usa en la presente memoria, un grupo reactivo es un átomo o átomos que reaccionan selectivamente con otro átomo formando un enlace covalente. Son ejemplos no limitantes $-(CH_2)SH$, $-(CH_2)_nBr$ y $-(CH_2)C(=O)Cl$.

Como se usa en la presente memoria, el término “aminoácido cargado positivamente” o “aminoácido catiónico” como se usa en la presente memoria incluye cualquier aminoácido de origen natural o no natural que tiene una cadena lateral cargada positivamente en condiciones fisiológicas normales. Son ejemplos de aminoácidos de origen natural cargados positivamente arginina, lisina e histidina.

Como se usa en la presente memoria, el término “aminoácido cargado negativamente” incluye cualquier aminoácido de origen natural o no natural que tiene una cadena lateral cargada negativamente en condiciones fisiológicas normales. Son ejemplos de aminoácidos de origen natural cargados negativamente ácido aspártico y ácido glutámico.

Como se usa en la presente memoria, el término “aminoácido hidrófilo” significa cualquier aminoácido que tiene una cadena lateral polar no cargada que es relativamente soluble en agua. Son ejemplos de aminoácidos hidrófilos de origen natural serina, treonina, tirosina, asparagina, glutamina y cisteína.

Como se usa en la presente memoria, el término “aminoácido hidrófobo” significa cualquier aminoácido que tiene una cadena lateral no polar no cargada que es relativamente insoluble en agua. Son ejemplos de aminoácidos hidrófobos de origen natural alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina.

Como se usa en la presente memoria, un “aminoácido derivatizado” es un aminoácido nativo que se ha modificado químicamente. Son ejemplos no limitantes hidroxiprolina, penicilamina y N-metilalanina.

Como se usa en la presente memoria, un mimético de aminoácido (isómero) es una molécula orgánica que se aproxima a la configuración estérica y electrónica del aminoácido que pretende reemplazar. Son ejemplos no limitantes

Aminoácido	Mimético
Cisteína	2-carboxi-3-tiopiperidina, penicilamina, homocisteína, 2-carboxi-3-bromopiridina, ácido 2-bromobenzoico, ácido 2-bromociclohexanoico
Prolina	Ácido pipercolico, Oic

Como se usa en la presente memoria, el término “giro beta” se define como un cambio de dirección de una cadena peptídica de 180° en el margen de 4 residuos aminoácidos. El CO del primer residuo (i) está unido por hidrógeno al NH del cuarto residuo (i+3). En el caso de STa, el residuo “i” es asparagina¹¹ y el residuo i+3 es cisteína¹⁴. En teoría, hay muchos de tipos de giros beta. Estos tipos de giro pueden clasificarse por los ángulos phi y psi de los segundo y tercer residuos (i+1 e i+2). Los criterios para giro de tipo I se dan en la tabla siguiente:

Tipo de giro	ángulo phi del residuo (i)	ángulo psi del residuo (i+1)	ángulo phi del residuo (i+2)	ángulo psi del residuo (i+3)
I	-60	-30	90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0

Por supuesto, un giro encontrado en una proteína real no tendrá los ángulos exactos anteriores, pero si los ángulos están próximos, entonces el giro puede clasificarse en consecuencia.

STa tiene un giro beta de tipo I de los residuos 11 a 14. Es un ejemplo de otro giro de tipo I el que se encuentra en la proteína subtilisina. El giro consiste en His39-Pro40-Asp41-Leu42. El CO de His39 (n) está unido por hidrógeno al NH de Leu42 (n+3), satisfaciendo la definición de giro beta. Además, se midieron los ángulos phi y psi para Pro40 (n+1) y Asp41 (n+2) usando Swiss PDB Viewer. Estas medidas de ángulo confirman que este es un giro de tipo I. Además, aunque es difícil de discernir a partir de la vista mostrada aquí, el O₂ de la prolina se extiende a la parte posterior o “abajo” como sería de esperar por un giro de tipo I.

Ángulo phi del residuo Pro40 (n+1)	Ángulo psi del residuo Pro40 (n+1)	Ángulo phi del residuo Asp41 (n+2)	Ángulo psi del residuo Asp41 (n+2)
-64,21	-17,19	-99,32	12,92

En un giro de tipo I, hay un enlace de hidrógeno entre el CO del residuo i y el NH del residuo i+3. Los ángulos diédricos del esqueleto del residuo son (-60, -30) y (-90, 0) de los residuos i+1 e i+2, respectivamente, del giro de

tipo I. A menudo se encuentra prolina en la posición i+1 de giros de tipo I, ya que su ángulo está limitado a -60° y su nitrógeno de imida no requiere un enlace de hidrógeno. La glicina está favorecida en esta posición en el tipo II', ya que requiere un valor de ϕ positivo (levógiro).

- 5 Para cada tipo, hay 4 secciones para cada residuo. Cada sección representa una posición en el giro. En cada sección, el primer número representa el número de ejemplos, el segundo número es el potencial y el tercer número es la significación, calculada por una prueba d. Se tomaron como significativos los valores con $\text{mod}(d) \geq 1,97$.

	Posición i	Posición i+1	Posición i+2	Posición i+3
I	21 0,32 -5,73	40 0,60 -3,33	19 0,29 -5,98	50 0,75 -2,07
F	40 0,81 1,37	21 0,42 -4,13	56 1,13 0,95	50 1,01 0,08
V	33 0,39 -5,78	61 0,72 -2,61	42 0,50 -4,76	65 0,77 -2,16
L	68 0,58 -3,38	70 0,70 -3,17	52 0,52 -5,05	74 0,74 -2,76
W	10 0,54 -1,98	12 0,65 -1,51	24 1,30 1,31	21 1,14 0,60
M	16 0,65 -1,75	13 0,53 -2,36	10 0,41 -2,97	15 0,61 -1,95
A	68 0,63 -3,99	115 1,07 0,76	86 0,80 -2,17	93 0,87 -1,46
G	109 1,07 0,74	41 0,40 -6,29	62 0,61 -4,12	242 2,38 14,51
C	36 1,57 2,75	20 0,87 -0,62	22 0,96 -0,20	31 1,35 1,69
Y	30 0,66 -2,37	28 0,61 -2,67	41 0,90, -0,71	39 0,85 -1,02
P	76 1,31 2,40	203 3,49 19,46	12 0,21 -6,20	2 0,03 -7,54
T	81 1,11 0,95	69 0,94 -0,49	105 1,44 3,85	81 1,11 0,95
S	120, 1,52 4,74	119 1,50 4,63	102 1,29 2,65	81 1,02 0,21
H	45 1,60 3,20	15 0,53 -2,52	28 0,99 -0,04	26 0,92 -0,42
E	54 0,74 2,28	112 1,54 4,72	88 1,21 1,83	74 1,02 0,13
N	125 2,25 9,50	38 0,68 -2,43	126 2,26 9,63	60 1,08 0,59
Q	31 0,72 -1,91	35 0,81 -1,29	51 1,18 1,18	25 0,58 -2,84
D	180 2,51 13,15	86 1,20 1,72	182 2,54 13,40	80 1,11 0,99
K	50 0,70 -2,57	85 1,20 1,70	72 1,01 0,11	78 1,10 0,85
R	36 0,64 -2,75	48 0,86 -1,11	49 0,88 -0,97	44 0,78 1,65

- 10 A partir de esto, para STa, se compararon las secuencias preferidas para ST: Asp/Asn11-Pro12-Asp/Asn13-Gly/Cys14 con la observada en STa: Asn11-Pro12-Ala13-Cys14

Asp>Asn>His>Cys>Ser>Pro>Thr>Gly

- 15 Cuando se comparan con la base de datos de análogos de ST, los análogos con Asp, Asn, Val, His y Tyr en el residuo 12 proporcionan agonistas potentes.

Pro>>Glu>SerAsp>Lys>Ala

- 20 Cuando se comparan con la base de datos de análogos de ST, los análogos con Pro, Aib, Val, Ala, Ile y D-Pro en el residuo 12 proporcionan todos agonistas potentes.

Asp>Asn>Thr>Trp>Ser>Glu>Gln>Lys

- 25 Cuando se comparan con la base de datos de análogos de ST, solo los análogos con Ala, Gly y Ser en el residuo 13 proporcionan agonistas potentes.

Gly>Cys>Trp>Thr>Asp

- 30 Cuando se comparan con la base de datos de análogos de ST, no son posibles sustituciones nativas en el residuo 12 que proporcionen agonistas potentes. Además, solo una mutación de entrecruzamiento con tioéter (Hidaka) exhibió alguna actividad. Existen numerosos aminoácidos no nativos que forman giros beta.

Según Sato (Biochem., 33: 8641-8650 (1994)), STa tiene una hélice 3_{10} de Cys⁶ a Cys₉, con un enlace de H característico entre el oxígeno de carbonilo de Cys⁶ y el nitrógeno de amida de Cys⁶. Una hélice 3_{10} tiene enlaces de H entre i e $i+3$ con 10 átomos entre los enlaces de H.

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término “entrecruzamientos” pretende hacer referencia a los enlaces formados entre grupos funcionales en las dos porciones de la molécula ligadas conjuntamente por ellos, concretamente los enlaces que entrecruzan dos partes de una molécula. Los enlaces formados por ligadores incluyen:
- 10 1. disulfuros [-S-S-]; tioéteres [-S-]; tiosulfóxidos [-S(=O)-]; grupos tiosulfonilo [-S(=O)₂-];
2. amidas, alquilamidas y arilamidas [-NR¹¹-C(=O)-]; tioamidas, alquiltioamidas y ariltioamidas [-NR¹¹-(C=S)-] en el que R¹¹ puede ser -H, -OH, grupos metileno [-CR¹²₂-], grupos metino [-CR¹²=CR¹²]; grupos polimetileno [- (CR¹²₂)_n-] en el que n es un entero de 2 a aproximadamente 16 y puede incluir grupos lineales y ramificados saturados [-CR¹²=CR¹²-] y/o insaturados [-CR¹²₂-CR¹²₂-], R¹² puede ser cualquier átomo, incluyendo hidrógeno;
- 15 3. grupos oxycarbonilo [-O-C(=O)-], grupos aminocarbonilo [-NH-C(=O)-], grupos carbonilo [-C(=O)-], grupos carboniloxilo [-C(=O)-O-], grupos carbonato [-O-C(=O)-O-], grupos carboniloximetileno oxycarbonilalquileo [C(=O)-OC(R²⁰R²¹)-O-C(=O)-(-CH₂)_n-] en que n es un entero de 1 a 16 y cada R²⁰ y R²¹ se selecciona independientemente del grupo consistente en H y metilo;
- 20 4. grupos uretano [-O-C(=O)NH-], grupos tiouretano [-O-(C=S)-NH-];
5. -NR³¹-CR³², R³³-CR³⁴R³⁵- en el que R³¹ puede seleccionarse del grupo consistente en H, un grupo alquilo de 1 a aproximadamente 16 átomos de carbono que puede ser lineal, ramificado, saturado, insaturado o contener un anillo carbocíclico de 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, o un grupo carbonilalquilo en el que el grupo alquilo se define inmediatamente antes; R³² y R³³ se seleccionan independientemente del grupo consistente en H, un grupo alquileo de 1 a aproximadamente 16 átomos de carbono que puede ser lineal, ramificado, saturado o insaturado, y puede contener un anillo carbocíclico de 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono; R³⁴ y R³⁵ se seleccionan independientemente del grupo consistente en H, un grupo alquilo de 1 a aproximadamente 16 átomos de carbono que puede ser lineal, ramificado, saturado, insaturado o contener un anillo carbocíclico de 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, o un grupo carbonilalquilo en el que el grupo alquilo es como se define anteriormente, o preferiblemente, cuando ambos R³⁴ y R³⁵ se toman conjuntamente forman un grupo carbonilo; y en el que al menos uno de R³² y R³³ no es H, preferiblemente -NR³¹-CR³², R³³-CR³⁴R³⁵- se seleccionan del grupo consistente en aminoácidos nativos y no nativos;
- 25 6. grupos metileno [-CR⁴¹₂-], grupos metino [-CR⁴¹=CR⁴¹]; grupos polimetileno, [- (CR⁴¹₂)_n-] en el que n es un entero de 2 a aproximadamente 16 y puede incluir grupos lineales y ramificados saturados [-CR⁴¹=CR⁴¹-] y/o insaturados [-CR⁴¹₂-CR⁴¹₂-]; R⁴¹ puede ser cualquier átomo, incluyendo hidrógeno;
- 30 7. grupos arilcarbonilo y alquilencarbonilo [- (CH₂)_n-C(=O)-] en el que n es un entero de 1 a aproximadamente 16;
8. grupos etilensulfoniletileno [-CH₂CH₂-S(=O)(=O)₂CH₂CH₂-];
- 35 9. grupos etilensulfonilmetileno oximetilensulfoniletileno [-CH₂CH₂-S(=O)₂-CH₂-O-CH₂-S(=O)₂-CH₂CH₂-];
10. grupos etilensulfonilmetilensulfoniletileno CH₂CH₂-S(=O)₂-CH₂-S(=O)₂-CH₂CH₂-];
- 40 11. grupos carboniloxilo [-C(=O)-O-];
12. grupos arilcarboniloximetileno oxycarbonilalquileo y alquilencarboniloximetileno oxycarbonilalquileo [- (CH₂)_n, C(=O)-OC(R⁵¹R⁵²)-O-C(=O)-(-CH₂)_n-] en que cada n se selecciona independientemente del grupo de enteros de 1 a 16 y cada uno de R⁵¹ y R⁵² se selecciona independientemente del grupo consistente en H y metilo;
- 45 13. grupos carbonilalquilencarbonilo [-C(=O)- (CH₂)_w-C(=O)-] en el que w es un entero de 1 a aproximadamente 6, tal como succinato y adipato.

Como se usa en la presente memoria, diarrea mediada por guanilato ciclasa C o diarrea mediada por GCC pretende hacer referencia a diarrea que está asociada a la actividad enzimática de guanilato ciclasa C (GCC). Es un ejemplo de diarrea mediada por GCC la diarrea infecciosa causada por la activación de la enzima GCC cuando la toxina termoestable (ST) de E. coli se une a receptores en células del colon de un individuo. Se hace referencia también a la diarrea infecciosa en la presente memoria como diarrea inducida por toxina termoestable de E. coli.

Como se usa en la presente memoria, “alquilo” significa grupos “alquilo” así como formas insaturadas y sustituidas tales como “alquilo sustituido”, “alqueno”, “alqueno sustituido”, “alquino”, “alquino sustituido” y “alcóxido”.

“Alquilo” hace referencia a un grupo hidrocarburo saturado de cadena ramificada, lineal o cíclica. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo y similares. En realizaciones preferidas, los grupos alquilo son alquilo C₁-C₆, prefiriéndose particularmente C₁-C₃.

5 “Alquilo sustituido” hace referencia a un grupo alquilo en el que uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan cada uno independientemente por otros sustituyentes.

10 “Alquenilo” hace referencia a un grupo hidrocarburo insaturado de cadena ramificada, lineal o cíclica que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. El grupo puede estar en conformación cis o trans alrededor del doble o dobles enlaces. Los grupos alquenilo típicos incluyen, pero sin limitación, etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, terc-butenilo, pentenilo, hexenilo y similares. En realizaciones preferidas, el grupo alquenilo es un alquenilo C₁-C₆, prefiriéndose particularmente C₁-C₃.

15 “Alquenilo sustituido” hace referencia a un grupo alquenilo en el que uno o más átomos de hidrógeno están cada uno independientemente reemplazado por otros sustituyentes.

20 “Alquinilo” hace referencia a un grupo hidrocarburo insaturado de cadena ramificada, lineal o cíclica que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinilo típicos incluyen, pero sin limitación, etinilo, propinilo, butinilo, isobutinilo, pentinilo, hexinilo y similares. En realizaciones preferidas, el grupo alquinilo es alquinilo C₁-C₆, prefiriéndose particularmente C₁-C₃.

25 “Alquinilo sustituido” hace referencia a un grupo alquinilo en el que uno o más átomos de hidrógeno están cada uno independientemente reemplazado por otros sustituyentes.

“Alcoxilo” hace referencia a un grupo -OR, en el que R es alquilo, alquenilo o alquinilo, como se define anteriormente.

30 Como se usa en la presente memoria, “arilo” significa “resto aromático”, “resto aromático sustituido”, “resto heteroaromático” y “resto heteroaromático sustituido”.

35 “Resto aromático” hace referencia a un resto que tiene un grupo hidrocarburo cíclico insaturado que tiene un sistema de (4n+2) electrones pi conjugados. Los restos aromáticos típicos incluyen, pero sin limitación, benceno, naftaleno, antraceno, azuleno, indaceno y similares. En realizaciones preferidas, el resto aromático contiene 5-20 carbonos en el sistema de anillo, siendo particularmente preferidos 5-10 átomos de carbono.

“Resto aromático sustituido” hace referencia a un resto aromático en el que uno o más átomos de hidrógeno están cada uno reemplazados independientemente con otros sustituyentes.

40 “Resto heteroaromático” hace referencia a un resto aromático en el que uno o más de los átomos de carbono de anillo están reemplazados por otro átomo tal como N, O o S. Los restos heteroaromáticos típicos incluyen, pero sin limitación, pirano, pirazol, piridina, pirrol, pirazina, piridazina, pirimidina, pirrolizina, quinazolina, quinolina, quinolizina, quinoxalina, selenofeno, tiofeno, telurofeno, xanteno y similares.

45 “Resto heteroaromático sustituido” hace referencia a un resto heteroaromático en el que uno o más átomos de hidrógeno están cada uno independientemente reemplazados por otros sustituyentes.

Descripción general

50 La presente invención surge del descubrimiento de la identificación de los determinantes estructurales de ligandos de GCC necesarios para la unión a GCC y la activación de GCC. En consecuencia, la retención de los determinantes estructurales requeridos para la unión a GCC y la activación de GCC proporciona compuestos que son agonistas de GCC, concretamente compuestos que se unen a GCC y la activan. Los compuestos de la invención incluyen agonistas que inducen la acumulación de GMP cíclico asociada a la unión de GCC a ligandos naturales. Por otro lado, la retención de los determinantes estructurales requeridos para la unión a GCC y la eliminación de los determinantes estructurales requeridos para la activación de GCC proporciona compuestos que son compuestos de GCC de la invención, concretamente compuestos que se unen a GCC sin activarla. Los compuestos de la invención incluyen compuestos de la invención que se unen a GCC pero no inducen la acumulación de GMP cíclico asociada a la unión de GCC a ligandos naturales.

60 Los compuestos de la invención que son agonistas tienen varios usos, incluyendo como compuestos anticancerosos. Pueden usarse solos o en combinación con otros compuestos terapéuticos. Además, pueden estar conjugados o no conjugados. La presente invención se refiere a compuestos de la invención para uso en métodos de tratamiento de individuos que tienen o se sospecha que tienen cáncer. Dichos compuestos son útiles en métodos de inhibición de la metástasis.

Los compuestos de la invención que son compuestos de la invención tienen varios usos incluyendo como compuestos antidiarreicos. Pueden usarse solos o en combinación con otros compuestos terapéuticos. Además, la presente invención se refiere a métodos de tratamiento de individuos que tienen o son sospechosos de tener un riesgo elevado de contraer diarrea mediante la administración de compuestos de la invención.

Debido a que los compuestos de la invención se unen a GCC, los péptidos y análogos peptídicos de la invención pueden usarse para preparar agentes imagenológicos, productos terapéuticos y reactivos de diagnóstico relacionados con la detección y el tratamiento de cáncer caracterizado por células que expresan GCC. Como se observa anteriormente, los péptidos y análogos peptídicos agonistas de la invención pueden usarse no conjugados para activar GCC en métodos de tratamiento de cáncer y prevención de metástasis. Los péptidos y análogos peptídicos de la invención compuestos de la invención pueden usarse para inhibir la activación de GCC en métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos en que la activación de GCC tiene efectos clínicos indeseables que pueden reducirse o inhibirse mediante la inhibición de la activación de GCC.

Los ligandos naturales de GCC incluyen los ligandos naturales endógenos guanilina y uroguanilina y las enterotoxinas termoestables (ST), una familia de péptidos estructuralmente relacionados producidos por diferentes organismos incluyendo, pero sin limitación, *E. coli*, *Yersinia*, *Enterobacter* y *Vibrio*. La Tabla 1 muestra las secuencias aminoácidas de estos ligandos naturales. Las posiciones numéricas a las que se hace referencia en la tabla son las posiciones del péptido STa de *E. coli* ampliamente estudiado.

Tabla 1

Posición				5	6			9	10				14			17	
STa de <i>E.coli</i>	NT	F	Y	<u>C</u>	<u>C</u>	E	L	<u>C</u>	<u>C</u>	N	P	A	<u>C</u>	A	G	<u>C</u>	Y
STh de <i>E.coli</i>	SSS	N	Y	<u>C</u>	<u>C</u>	E	L	<u>C</u>	<u>C</u>	N	P	A	<u>C</u>	T	G	<u>C</u>	Y
<i>Yersinia</i>	SSDW	D	Y	<u>C</u>	<u>C</u>	D	L	<u>C</u>	<u>C</u>	N	P	A	<u>C</u>	A	G	<u>C</u>	Y
<i>Vibrio</i>		I	D	<u>C</u>	<u>C</u>	E	I	<u>C</u>	<u>C</u>	N	P	A	<u>C</u>	F	G	<u>C</u>	L N
Guanilina		P	N	T	<u>C</u>	E	I	<u>C</u>	A	Y	A	A	<u>C</u>	T	G	<u>C</u>	
Uroguanilina		Q	E	D	<u>C</u>	E	I	<u>C</u>	I	N	V	A	<u>C</u>	T	G	<u>C</u>	

Los péptidos de ST tienen cada uno seis residuos de cisteína, mientras que los ligandos endógenos tienen cada uno cuatro. En los péptidos de ST, las seis cisteínas forman tres enlaces disulfuro: el aminoácido 5 forma un enlace disulfuro con el aminoácido 10 (bucle A), el aminoácido 6 forma un enlace disulfuro con el aminoácido 14 (bucle B) y el aminoácido 8 forma un enlace disulfuro con el aminoácido 17 (bucle C). En los péptidos endógenos, la cuatro cisteínas forman dos enlaces disulfuro: el aminoácido 6 forma un enlace disulfuro con el aminoácido 14 (bucle B) y el aminoácido 8 forma un enlace disulfuro con el aminoácido 17 (bucle C). En cada péptido, aparece un dipéptido entre la posición 6 y 9 que produce un giro de hélice 3_{10} . Cada péptido incluye un giro de tipo IT (β) entre las posiciones 9 y 14.

Algunos aspectos de la presente invención proporcionan agonistas de GCC que retienen el giro de hélice 3_{10} entre las posiciones 6 y 9 y el giro β entre las posiciones 9 y 14, reteniendo el entrecruzamiento entre la posición 5 y 10 (bucle A) y eliminando el entrecruzamiento entre la posición 6 y 14 (bucle B) y el entrecruzamiento entre las posiciones 9 y 17 (bucle C). Se hace referencia a estos compuestos como compuestos de bucle A de la invención. Se ha descubierto que la retención de los tres determinantes estructurales (giro de hélice 3_{10} entre 6 y 9, giro β entre 9 y 14 y entrecruzamiento entre 5-10) y la eliminación de los dos determinantes estructurales (entrecruzamiento 6-14 y entrecruzamiento 9-17) proporciona compuestos que se unen a GCC pero no activan la cascada de señalización asociada a la unión de GCC a ligandos naturales. En algunas realizaciones, el aminoácido en posición 5 puede eliminarse, en cuyo caso el aminoácido en posición 6 se une al aminoácido en 10. En algunas realizaciones, el aminoácido en posición 10 puede eliminarse, en cuyo caso el aminoácido en posición 5 se une al aminoácido en 9. En algunas realizaciones, los aminoácidos en posición 5 y en posición 10 pueden eliminarse, en cuyo caso el aminoácido en posición 6 se une al aminoácido en 9. En algunas realizaciones, el aminoácido en posición 5 puede estar presente, pero no se entrecruza y el aminoácido en posición 6 se entrecruza con la posición aminoacídica 10. En algunas realizaciones, los aminoácidos en posición 5 y posición 10 pueden estar presentes pero no entrecruzarse y el aminoácido en posición 6 se entrecruza con el aminoácido en posición 9. En algunas realizaciones, el aminoácido en posición 10 puede estar presente pero no se entrecruza y el aminoácido en posición 5 se entrecruza con el aminoácido en posición 9. Pueden estar ligados al aminoácido 14 aminoácidos u otros restos. En algunas realizaciones, la posición en el extremo C del aminoácido 14 es COOH. En algunas realizaciones, la posición en el extremo C del aminoácido 14 es 1-30 aminoácidos, tal como por ejemplo las secuencias nativas 15-18, a condición de que el aminoácido en posición 17 no se entrecruce.

Algunos aspectos de la presente invención proporcionan agonistas de GCC que retienen el giro de hélice 3_{10} entre las posiciones 6 y 9 y el giro β entre las posiciones 9 y 14, reteniendo el entrecruzamiento entre las posiciones 6 y 14 (bucle B), eliminando el entrecruzamiento entre las posiciones 9 y 17 (bucle C) y reteniendo opcionalmente el

entrecruzamiento entre las posiciones 5 y 10 (bucle A). Si el compuesto no tiene una cola ligada al extremo C de la posición 14, el compuesto es un agonista de bucle B. En algunas realizaciones, el compuesto tiene dicha cola, pero es degradable por una enzima u otro medio presente en el individuo al que se administra. En dichos casos, el compuesto es un "agonista in vivo" porque actuará como compuesto de la invención in vitro pero se convertirá en un agonista in vivo. Un agonista in vivo puede mantenerse como compuesto de la invención in vivo si se inhibe la enzima que degrada su cola. Por ejemplo, un agonista de bucle B in vivo con una cola que se retira por elastasa, tal como AGA, puede mantenerse como compuesto de bucle B de la invención in vivo administrando un inhibidor de elastasa junto con él. En algunas realizaciones, el compuesto de bucle B de la invención sirve como profármaco que se convierte en agonista de bucle B in vivo por un medio ya presente en el individuo o por la adición de un agente que lo convertirá. Se ha descubierto que la retención de los tres determinantes estructurales (giro de hélice 3_{10} entre 6 y 9, giro β entre 9 y 14 y entrecruzamiento 6-14) y la eliminación del determinante estructural (entrecruzamiento 9-17) proporciona compuestos que se unen a GCC y, a condición de que no tengan cola en el extremo C, activan la cascada de señalización asociada a la unión a GCC de ligandos naturales. En algunas realizaciones, el aminoácido en posición 5 puede eliminarse. En algunas realizaciones, el aminoácido en posición 10 puede eliminarse. En algunas realizaciones, los aminoácidos en posiciones 5 y 10 pueden eliminarse. En algunas realizaciones, los aminoácidos en posiciones 5 y 10 están presentes, pero no se entrecruzan. En algunas realizaciones, los aminoácidos en posiciones 5 y 10 están presentes y se entrecruzan entre sí. Pueden estar ligados al aminoácido 14 aminoácidos u otros restos, a condición de que dichos aminoácidos u otros restos puedan escindirse o retirarse de otro modo de la molécula in vivo si el compuesto va a ser un agonista. En algunas realizaciones, la posición en el extremo C del aminoácido 14 es COOH. En algunas realizaciones, la posición en el extremo C del aminoácido 14 es 1-30 aminoácidos, tal como por ejemplo las secuencias nativas 15-18, a condición de que el aminoácido en posición 17 no se entrecruce.

Compuestos de la divulgación

El objeto en cuestión para el que se persigue protección es como se define en las reivindicaciones. Los compuestos de la divulgación tienen estructuras según

(I) R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R6 - R7

en la que:

R1 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R2 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que opcionalmente se entrecruza, como se define en la presente memoria, con R6;

R3 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido a condición de que se entrecruce con R8, como se define en la presente memoria;

R4 es un dipéptido que comprende uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido, en el que dicho dipéptido o mimético de dipéptido forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R3 con R5;

R5 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido a condición de que no se entrecruce con R9;

R6 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que opcionalmente se entrecruza con R2, como se define en la presente memoria;

R7 es un tripéptido que comprende uno, dos o tres aminoácidos naturales, uno, dos o tres aminoácidos bloqueados, uno, dos o tres miméticos de aminoácidos o un mimético de tripéptido, en el que dicho tripéptido o mimético de tripéptido forma un grupo de giro β que liga R6 con R8;

R8 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido a condición de que se entrecruce con R3, como se define en la presente memoria;

R9 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos, a condición de que no se entrecruce con R5.

Según aspectos de la presente divulgación, los compuestos de la invención tienen la estructura de fórmula (I) a condición de que los compuestos no sean:

C-hC-E-L-A-C-N-P-A-X; hC

C-E-L-A-X-N-P-A-C;

C-C-E-L-A-C-N-P-A-C;

C-C-E-L-A-C-N-P-A-C-T-G-A;

Y-Ca-C-E-L-F-Ca-N-P-A-C;

Y-C-C-E-L-mA-C-N-P-A-C;

Y-C-C-E-mL-A-C-N-P-A-C;

C-C-E-L-Cm-C-N-P-A-C-A-G-Cm;

C-C-E-L-Ca-C-N-P-A-C-A-G-Ca; y

X-Ca-E-L-A-hC-N-P-A-Ca;

en las que:

hC es homocisteína;

X es alanina ligada con hC a través de un enlace CH₂S covalente entre una cadena lateral de Ala y una cadena lateral de hC;

Cm es (S-metoxibencil)cisteína y

Ca es (S-acetamidometil)cisteína.

En algunas realizaciones preferidas, R₁ es preferiblemente 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilo, uno o más de 1-50 alquilo sustituidos, uno o más de 1-50 arilo, uno o más de 1-50 arilo sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilo, uno o más de 1-50 alquilarilo sustituidos o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R₁ es 0-20 aminoácidos. En algunas realizaciones, R₁ es menor de 1000 Da. En algunas realizaciones, R₁ es Y, NTFY, SSSNY, SSDWDY, ID, PN o QE.

En algunas realizaciones preferidas, R₂ es un análogo de cadena lateral de cisteína [-(CR₂)_n-S o -(CR₂)_n-H; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], o grupos arilo, alquilo y arilalquilo que pueden entrecruzarse o no con Cys₁₀. En algunas realizaciones, R₂ es 2-carboxi-3-bromopiridina, ácido 2-bromobenzoico o ácido 2-bromociclohexanoico. R₂ es preferiblemente C entrecruzada con R₆, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R₆ por un ligamiento Carba, cualquier aa o mimético sin entrecruzamiento.

En algunas realizaciones preferidas, R₃ es un análogo de cadena lateral de cisteína [-(CR₂)_n-S o -(CR₂)_n-H; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys₁₄ a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente) o un mimético de aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R₃ es preferiblemente C entrecruzada con C de R₈ o cualquier otro resto entrecruzado con R₈.

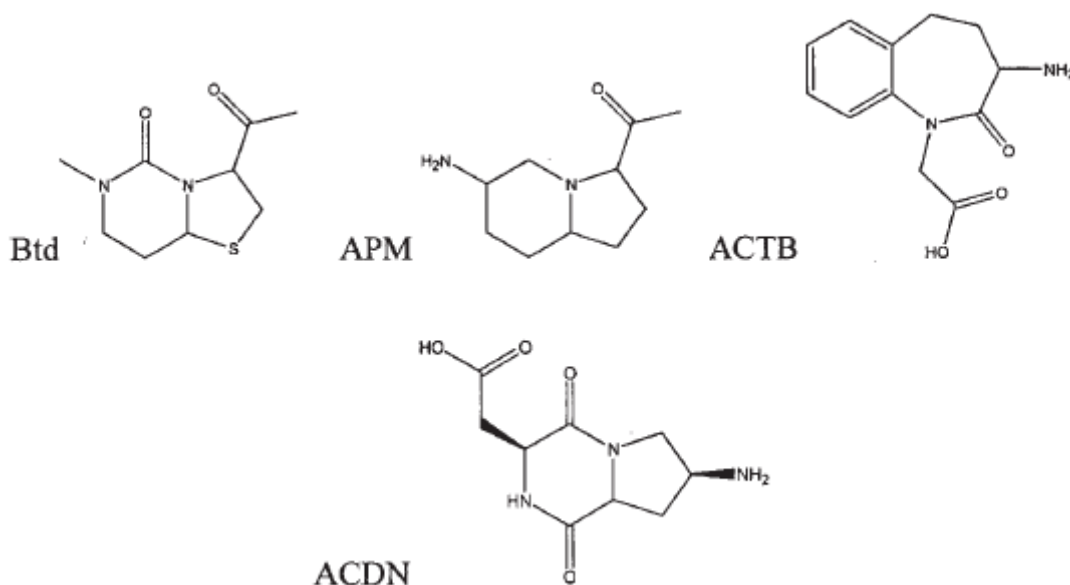
En algunas realizaciones preferidas, R₄ es un solo aminoácido (de todos los tipos), dipéptido, mimético de dipéptido y ligamiento de cadena, particularmente estructuras con 4-8 átomos que cubren el hueco entre R₃ y R₅, lo más preferiblemente estructuras con 6 átomos que cubren el hueco entre R₃ y R₅. Son aminoácidos preferidos para R₄ sarcosina, ornitina y lisina. Son reemplazos aminoacídicos preferidos de Glu₇ Gln, Gly, Ser, Ala, Pro, Asp, Asn y ácido L-octahidroindol-2-carboxílico y sus análogos de N-alquilo, hidroxilo o N-arilo. Son reemplazos aminoacídicos preferidos de Leu₈ Ile, norleucina, Met, Val, Phe, Trp, Tyr, Gln, Gly, Ala, Pro y ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo. R₄ es preferiblemente un dipéptido tal como E-L o E-N-metil-Leu.

En algunas realizaciones preferidas, R₅ es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente los hidrófobos o neutros, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala, Thr, Leu, N(Me)-Leu, Phe y cisteína bloqueada, serina y treonina o un mimético de aminoácido tal como ácido L-1,2,3,4-

tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. En algunas realizaciones preferidas, R5 puede comprender aminoácidos o moléculas orgánicas con una hidrofobicidad de al menos -2,0 (el ácido glutámico es el AA nativo menor con un valor de -1,22), y preferiblemente un valor mayor de 0, y más preferiblemente un valor mayor de 1. La hidrofobicidad se determina por el método de Sweet y Eisenberg (Sweet R.M., Eisenberg D., J. Mol. Biol. 171: 479-488 (1983)). R5 es preferiblemente A L, T, F, V, I, Y, N-metil-Leu, N-metil-Ala y N-metil-Val.

En algunas realizaciones preferidas, R6 es un solo aminoácido (de todos los tipos) o un análogo de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo de uno, un mimético de aminoácido tal como aquel que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R6 es preferiblemente C entrecruzada con R2, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R2 por un ligamiento Carba o cualquier aminoácido o mimético sin entrecruzamiento.

En algunas realizaciones preferidas, R7 es un mimético de dipéptido tal como biciclo-L-serilprolina, Btd, APM, ACTB o ACDN.



En algunas realizaciones, R7 es X-Y-Z en el que:

X es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Asn, Asp, Ala, His, GlnGly, β -alanina, o uno corto (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo o aminoácidos sintéticos, preferiblemente isoasparagina o β -alanina.

Y es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Pro, Ile, Ala, Val (tanto D como L) y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo; aminoácidos sintéticos tales como homoPro, ácido nipecótico, ácido isonipecótico, Oic, Tic, Aib, aminobenzoato, carboxipiperidina, carboxilato de azetidina y ácido aminociclopentenocarboxílico; o miméticos de aminoácidos tales como ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico que limitan los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables.

Z es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente sin cadena lateral (Gly, β -alanina), o una corta (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala y Gly.

R7 es preferiblemente un tripéptido N-P-A.

En algunas realizaciones preferidas, R8 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys14 a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente) o un mimético de aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R8 es preferiblemente C entrecruzada con C de R3 o cualquier otro resto entrecruzado con R3.

En algunas realizaciones preferidas, R9 es preferiblemente menor de 1000 Da. R9 es preferiblemente 0-20 aminoácidos, AGA o Y.

Se prefiere que el compuesto de la invención sea lo más pequeño posible. Por tanto, se prefiere que el compuesto de la invención sea una molécula pequeña no peptídica o un péptido pequeño, preferiblemente de menos de 25 aminoácidos, más preferiblemente de menos de 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el compuesto de unión a GCC de la invención está en forma de una composición conjugada de menos de 15 aminoácidos. Puede usarse un compuesto de la invención que comprenda 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos según la presente invención. Esta dentro del alcance de la presente invención incluir moléculas mayores que sirvan como compuestos de la invención.

La presente divulgación se refiere también a compuestos que son compuestos de bucle A de la invención. La presente divulgación se refiere a compuestos que tienen la fórmula (II):

(II) R201 - R202 - R203 - R204 - R205 - R206 - R207

en la que:

R201 está ausente o se selecciona del grupo consistente en: 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R202 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R205 o R206, en el que si R202 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, entonces R203 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R205 o R206;

R203 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, o si R202 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, entonces R203 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R205 o R206;

R204 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que R204 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R203 con R205;

R205 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, o si R206 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, entonces R205 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R202 o R203;

R206 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R202 o R203, en el que si R206 está ausente o es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con ningún otro aminoácido, entonces R205 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R202 o R203; y

R207 está ausente o es 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones preferidas, R201 es preferiblemente 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R1 es 0-20 aminoácidos. En algunas realizaciones, R201 es menor de 1000 Da. En algunas realizaciones, R201 es Y, NTFY, SSSNY, SSDWDY, ID, PN o QE.

En algunas realizaciones preferidas, R202 es una cisteína. En algunas realizaciones preferidas, R202 es una penicilamina. En algunas realizaciones preferidas, R202 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], o grupos arilo, alquilo y arilalquilo que pueden entrecruzarse o no con Cys10. En algunas realizaciones, R202 es 2-carboxi-3-bromopiridina, ácido 2-bromobenzoico o ácido 2-bromociclohexanoico. R202 es preferiblemente C entrecruzada con R206 o R205, o C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R206 por un ligamiento Carba, cualquier aa o mimético sin entrecruzamiento.

En algunas realizaciones preferidas, R203 está ausente o no puede formar un entrecruzamiento (tal como siendo y por ejemplo una Cys bloqueada, alanina, serina u otro α -aminoácido). En realizaciones en que R202 no forma un entrecruzamiento, R203 forma un entrecruzamiento y puede ser, por ejemplo, cisteína, penicilamina u otro análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en los que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], o grupos arilo, alquilo y arilalquilo. En algunas de dichas realizaciones, R203 puede ser como se describe R202 anteriormente y entrecruzarse con R206 o R205.

En algunas realizaciones preferidas, R204 es un solo aminoácido (de todos los tipos), dipéptido, mimético de dipéptido y ligamiento de cadena, particularmente estructuras con 4-8 átomos que cubren el hueco entre R203 y R205, lo más preferiblemente estructuras con 6 átomos que cubren el hueco entre R203 y R205. Son aminoácidos preferidos para R204 sarcosina, ornitina y lisina. Son reemplazos aminoacídicos de Glu7 preferidos Gln, Gly, Ser, Ala, Pro, Asp, Asn y ácido L-octahidroindol-2-carboxílico, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroilo o N-arilo. Son reemplazos aminoacídicos de Leu8 preferidos Ile, norleucina, Met, Val, Phe, Trp, Tyr, Gln, Gly, Ala, Pro y ácido L-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-carboxílico y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo. R204 es preferiblemente un dipéptido tal como E-L o E-N-metil-Leu.

En algunas realizaciones preferidas, R205 es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente los hidrófobos o neutros, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala, Thr, Leu, N(Me)-Leu, Phe y cisteína bloqueada, serina y treonina o un mimético de aminoácido tal como ácido L-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-carboxílico que limita los ángulos diédricos o la cadena secundaria a configuraciones favorables. En algunas realizaciones preferidas, R205 puede comprender aminoácidos o moléculas orgánicas con una hidrofobicidad de al menos -2.0 (el ácido glutámico es el AA nativo menor con un valor de -1,22), y preferiblemente un valor mayor de 0, y más preferiblemente un valor mayor de 1. La hidrofobicidad se determina por el método de Sweet y Eisenberg (Sweet R.M., Eisenberg D., J. Mol. Biol. 171: 479-488 (1983)). R205 es preferiblemente A L, T, F, V, I, Y, N-metil-Leu, N-metil-Ala y N-metil-Val. En realizaciones, R205 esta ausente o no puede formar un entrecruzamiento (tal como siendo y por ejemplo una Cys bloqueada, alanina, serina u otro α -aminoácido). En realizaciones en que R206 no forma un entrecruzamiento, R205 forma un entrecruzamiento y puede ser, por ejemplo, cisteína, penicilamina u otro análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en los que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], o grupos arilo, alquilo y arilalquilo. En algunas de dichas realizaciones, R205 puede ser como se describe R202 anteriormente y entrecruzarse con R203 o R206.

En algunas realizaciones preferidas, R206 es una cisteína. En algunas realizaciones preferidas, R206 es penicilamina. En algunas realizaciones preferidas, R206 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en los que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], o grupos arilo, alquilo y arilalquilo. En algunas realizaciones, R206 es 2-carboxi-3-bromopiridina, ácido 2-bromobenzoico o ácido 2-bromociclohexanoico. R206 es preferiblemente C entrecruzada con R202, o R202, o C entrecruzada tal como Cmob, entrecruzada con R202 por un ligamiento Carba, cualquier aa o mimético sin entrecruzamiento.

En algunas realizaciones preferidas, R207 está ausente, es COOH, NPAAAGCacmY o ST11-18 con un cambio en 17 para retirar la función de entrecruzamiento.

La presente invención se refiere a compuestos que son compuestos de bucle B. La presente divulgación se refiere también a compuestos que tienen la fórmula (III):

(III) R301 - R302 - R303 - R304 - R305 - R306 - R307- R308 - R309

en la que:

R301 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R302 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido en el que R302 puede entrecruzarse con R306;

R303 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R308;

5 R304 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que

R304 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R303 con R305;

10 R305 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con R309;

R306 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido, en el que R306 puede entrecruzarse con R302;

15 R307 es uno, dos o tres aminoácidos naturales, uno, dos o tres aminoácidos bloqueados, uno, dos o tres miméticos de aminoácidos o un mimético de tripéptido o combinaciones de los mismos, en el que R307 forma un giro beta que liga R306 con R308;

20 R308 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R303;

25 R309 está ausente o es 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos, que no se entrecruza con R305;

en los que la estructura de los compuestos no es:

30 C-hC-E-L-A-C-N-P-A-X; hC

C-E-L-A-X-N-P-A-C;

35 C-C-E-L-A-C-N-P-A-C;

C-C-E-L-A-C-N-P-A-C-T-G A;

Y-Ca-C-E-L-F-Ca-N-P-A-C;

40 Y-C-C-E-L-niA-C-N-P-A-C;

Y-C-C-E-mL-A-C-N-P-A-C;

C-C-E-L-Cm-C-N-P-A-C-A-G-Cm;

45 C-C-E-L-Ca-C-N-P-A-C-A-G-Ca; o

X-Ca-E-L-A-hC-N-P-A-Ca;

50 en las que:

hC es homocisteína;

55 X es alanina ligada con hC a través de un enlace CH₂S covalente entre una cadena lateral de Ala y una cadena lateral de hC;

Cm es (S-metoxibencil)cisteína y

Ca es (S-acetamidometil)cisteína.

60 En algunas realizaciones preferidas R301 es preferiblemente 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R301 es 0-20 aminoácidos. En algunas realizaciones, R301 es menor de 1000 Da. En algunas realizaciones, R301 es Y, NTFY, SSSNY, SSDWDY, ID, PN o QE.

65

En algunas realizaciones preferidas, R302 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], o grupos arilo, alquilo y arilalquilo que pueden entrecruzarse o no con Cys10 (R306). En algunas realizaciones, R302 es 2-carboxi-3-bromopiridina, ácido 2-bromobenzoico o ácido 2-bromociclohexanoico. R302 es preferiblemente C entrecruzada con R306, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R306 por un ligamiento Carba cualquier aa o mimético sin entrecruzamiento.

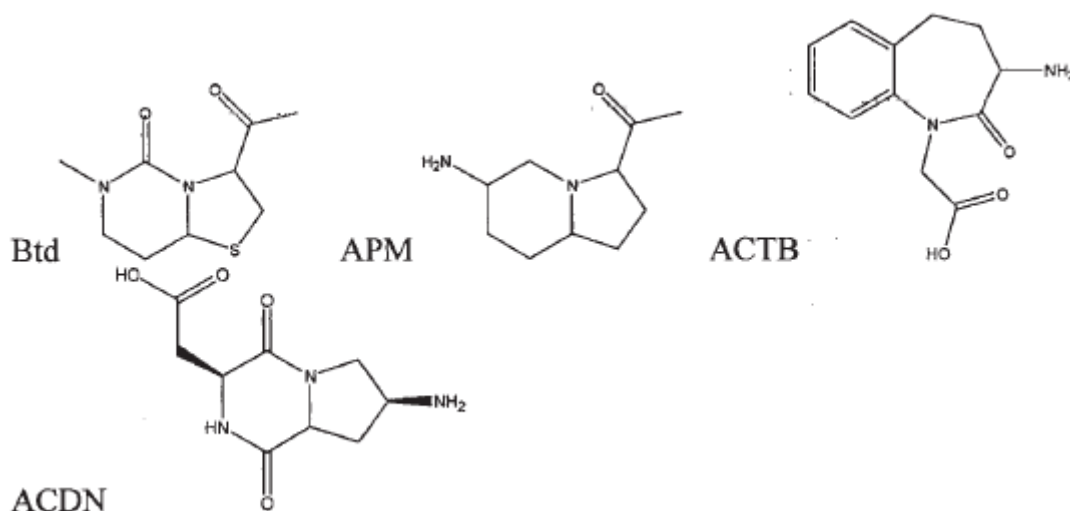
En algunas realizaciones preferidas, R303 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys14 (R308) a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente) o un mimético de aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R303 es preferiblemente C entrecruzada con C en R308 o cualquier otro resto entrecruzado con R308.

En algunas realizaciones preferidas, R304 es un solo aminoácido (de todos los tipos), dipéptido, mimético de dipéptido y ligamiento de cadena, particularmente estructuras con 4-8 átomos que cubren el hueco entre R303 y R305, lo más preferiblemente estructuras con 6 átomos que cubren el hueco entre R303 y R305. Son aminoácidos preferidos para R304 sarcosina, ornitina y lisina. Son reemplazos aminoácídicos preferidos de Glu7 Gln, Gly, Ser, Ala, Pro, Asp, Asn y ácido L-octahidroindol-2-carboxílico y sus análogos de N-alquilo, hidroxilo o N-arilo. Son reemplazos aminoácídicos preferidos de Leu8 Ile, norleucina, Met, Val, Phe, Trp, Tyr, Gln, Gly, Ala, Pro y ácido L-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-carboxílico, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo. R304 es preferiblemente un dipéptido tal como E-L o E-N-metil-Leu.

En algunas realizaciones preferidas, R305 es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente los hidrófobos o neutros, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala, Thr, Leu, N(Me)-Leu, Phe y cisteína bloqueada, serina y treonina o un mimético aminoácídico tal como ácido L-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-carboxílico que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. En algunas realizaciones preferidas, R305 puede comprender aminoácidos o moléculas orgánicas con una hidrofobicidad de al menos -2,0 (el ácido glutámico es el AA nativo menor con un valor de -1,22), y preferiblemente un valor mayor de 0, y más preferiblemente un valor mayor de 1. La hidrofobicidad se determina por el método de Sweet y Eisenberg (Sweet R.M., Eisenberg D., J. Mol. Biol. 171: 479-488 (1983)). R305 es preferiblemente A L, T, F, V, I, Y, N-metil-Leu, N-metil-Ala y N-metil-Val.

En algunas realizaciones preferidas, R306 es un solo aminoácido (de todos los tipos), o un análogo de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo de uno o un mimético aminoácídico que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R306 es preferiblemente C entrecruzada con R302, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R302 por un ligamiento Carba o cualquier aminoácido o mimético sin entrecruzamiento.

En algunas realizaciones preferidas, R307 es un mimético de dipéptido tal como biciclo-L-serilprolina, Btd, APM, ACTB o ACDN.



En algunas realizaciones, R307 es X-Y-Z en la que:

X es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Asn, Asp, Ala, His, Gln, Gly, β -alanina, o uno corto (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo o un aminoácido sintético, preferiblemente isoasparagina o β -alanina.

Y es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Pro, Ile, Ala, Val (tanto D como L) y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, aminoácidos sintéticos tales como homoPro, ácido nipecótico, ácido isonipecótico, Oic, Tic, Aib, aminobenzoato, carboxipiperidina, carboxilato de azetidina y ácido aminociclopentenocarboxílico o miméticos aminoácidos tales como ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico que limitan los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables.

Z es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente sin cadena lateral (Gly, β -alanina), o una corta (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala y Gly.

R307 es preferiblemente un tripéptido N-P-A.

En algunas realizaciones preferidas, R308 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys6 (R303) a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente) o un mimético de aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R308 es preferiblemente C entrecruzada con C en R303 o cualquier otro resto entrecruzado con R303.

En algunas realizaciones preferidas, R309 es menor de 1000 Da. R9 es preferiblemente 0-20 aminoácidos, NPAAAGCacmY o ST11-18 con un cambio en 17 para retirar la función de entrecruzamiento, COOH, AGA o Y.

En algunas realizaciones, los compuestos de bucle B no tienen cola en R309 o tienen una que puede escindir de tal modo que la molécula se vuelve un agonista. La presente divulgación se refiere adicionalmente a compuestos agonistas de bucle B que tienen la fórmula (IV):

(IV) R401 - R402 - R403 - R404 - R405 - R406 - R407- R408 - R409

en la que:

R401 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;

R402 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido en el que R402 puede entrecruzarse con R406;

R403 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R408;

R404 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que

R404 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R403 con R405;

R405 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con R409;

R406 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido, en el que R406 puede entrecruzarse con R402;

R407 es uno, dos o tres aminoácidos naturales, uno, dos o tres aminoácidos bloqueados, uno, dos o tres miméticos de aminoácidos o un mimético de tripéptido o combinaciones de los mismos, en el que R407 forma un giro beta que liga R406 con R408;

R408 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R403;

R409 está ausente o es 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos,

uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos, que no se entrecruza con R405.

En algunas realizaciones preferidas, R401 es preferiblemente 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R401 es 0-20 aminoácidos. En algunas realizaciones, R401 es menor de 1000 Da. En algunas realizaciones, R401 es Y, NTFY, SSSNY, SSDWDY, ID, PN o QE.

En algunas realizaciones preferidas, R402 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], o grupos arilo, alquilo y arilalquilo que pueden entrecruzarse o no con Cys10 (R406). En algunas realizaciones, R402 es 2-carboxi-3-bromopiridina, ácido 2-bromobenzoico o ácido 2-bromociclohexanoico. R402 es preferiblemente C entrecruzada con R406, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R406 por un ligamiento Carba cualquier aa o mimético sin entrecruzamiento.

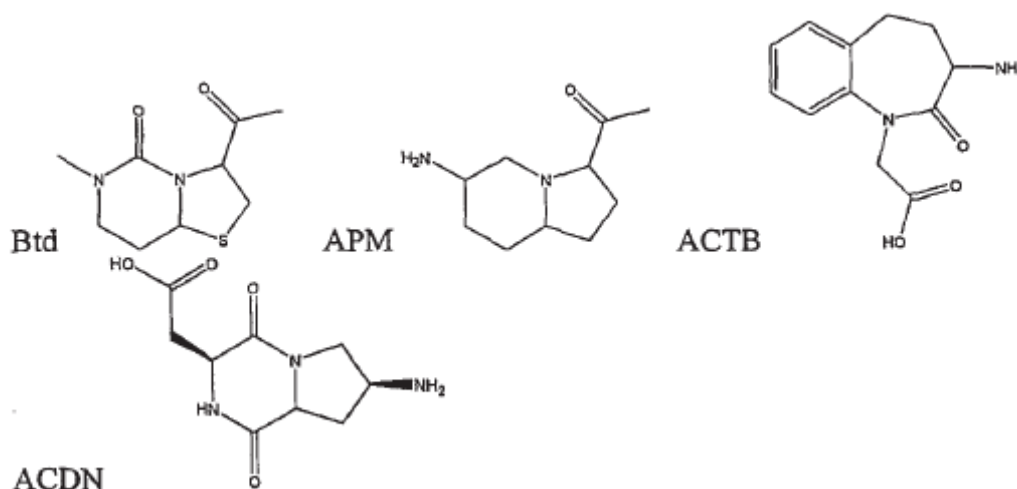
En algunas realizaciones preferidas, R403 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys14 (R408) a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente) o un mimético de aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R403 es preferiblemente C entrecruzada con C en R408 o cualquier otro resto entrecruzado con R408.

En algunas realizaciones preferidas, R404 es un solo aminoácido (de todos los tipos), dipéptido, mimético de dipéptido y ligamiento de cadena, particularmente estructuras con 4-8 átomos que cubren el hueco entre R403 y R405, lo más preferiblemente estructuras con 6 átomos que cubren el hueco entre R403 y R405. Son aminoácidos preferidos para R404 sarcosina, ornitina y lisina. Son reemplazos aminoacídicos preferidos de Glu7 Gln, Gly, Ser, Ala, Pro, Asp, Asn y ácido L-octahidroindol-2-carboxílico y sus análogos de N-alquilo, hidroxilo o N-arilo. Son reemplazos aminoacídicos preferidos de Leu8 Ile, norleucina, Met, Val, Phe, Trp, Tyr, Gln, Gly, Ala, Pro y ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo. R4 es preferiblemente un dipéptido tal como E-L o E-N-metil-Leu.

En algunas realizaciones preferidas, R405 es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente los hidrófobos o neutros, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala, Thr, Leu, N(Me)-Leu, Phe y cisteína bloqueada, serina y treonina o un mimético de aminoácido tal como ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. En algunas realizaciones preferidas, R405 puede comprender aminoácidos o moléculas orgánicas con una hidrofobicidad de al menos -2,0 (el ácido glutámico es el AA nativo menor con un valor de -1,22), y preferiblemente un valor mayor de 0, y más preferiblemente un valor mayor de 1. La hidrofobicidad se determina por el método de Sweet y Eisenberg (Sweet R.M., Eisenberg D., J. Mol. Biol. 171: 479-488 (1983)). R405 es preferiblemente A L, T, F, V, I, Y, N-metil-Leu, N-metil-Ala y N-metil-Val.

En algunas realizaciones preferidas, R406 es un solo aminoácido (de todos los tipos) o un análogo de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo de uno o un mimético de aminoácido tal que limita los ángulos diédricos de la cadena lateral a configuraciones favorables. R406 es preferiblemente C entrecruzada con R402, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R402 por un ligamiento Carba o cualquier aminoácido o mimético sin entrecruzamiento.

En algunas realizaciones preferidas, R407 es un mimético de dipéptido tal como biciclo-L-serilprolina, Btd, APM, ACTB o ACDN.



En algunas realizaciones, R407 es X-Y-Z en la que:

- 5 X es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Asn, Asp, Ala, His, GlnGly, β -alanina), o uno corto (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo o aminoácidos sintéticos, preferiblemente isoasparagina o β -alanina.

- 10 Y es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Pro, Ile, Ala, Val (tanto D como L) y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo; aminoácidos sintéticos tales como homoPro, ácido nipecótico, ácido isonipecótico, Oic, Tic, Aib, aminobenzoato, carboxipiperidina, carboxilato de azetidina y ácido aminociclopentenocarboxílico; o miméticos de aminoácidos tales como ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico que limitan los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables.

- 15 Z es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente sin cadena lateral (Gly, β -alanina), o una corta (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala y Gly.

R407 es preferiblemente un tripéptido N-P-A.

- 20 En algunas realizaciones preferidas, R408 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys6 (R403) a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente) o un mimético de aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R408 es preferiblemente C entrecruzada con C en R403 o cualquier otro resto entrecruzado con R403.

- 30 En algunas realizaciones preferidas, R409 es preferiblemente COOH. En algunas realizaciones, R9 es preferiblemente 0-20 aminoácidos, a condición de que sea escindible in vivo para convertirse en un agonista. Son ejemplos de colas escindibles NPAAAGCacmY y ST11-18 con un cambio en 17 para retirar la función de entrecruzamiento.

La presente divulgación se refiere también a compuestos que son profármacos de bucle B, es decir compuestos de bucle B que tienen colas que los vuelven compuestos de la invención cuyas colas son escindibles. La presente divulgación se refiere a compuestos que tienen la fórmula (V):

35 (V): R501 - R502 - R503 - R504 - R505 - R506 - R507- R508 - R509

en la que:

- 40 R501 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilo, uno o más de 1-50 alquilo sustituidos, uno o más de 1-50 arilo, uno o más de 1-50 arilo sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilo, uno o más de 1-50 alquilarilo sustituidos o combinaciones de los mismos;

- 45 R502 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido en el que R502 puede entrecruzarse con R506;

R503 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R508;

- 5 R504 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que

R504 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R503 con R505;

- 10 R505 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con R509;

R506 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido, en el que R506 puede entrecruzarse con R502;

- 15 R507 es uno, dos o tres aminoácidos naturales, uno, dos o tres aminoácidos bloqueados, uno, dos o tres miméticos de aminoácidos o un mimético de tripéptido o combinaciones de los mismos, en el que R507 forma un giro beta que liga R506 con R508;

- 20 R508 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R503;

- 25 R509 es 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilo, uno o más de 1-50 alquilo sustituidos, uno o más de 1-50 arilo, uno o más de 1-50 arilo sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilo, uno o más de 1-50 alquilarilo sustituidos o combinaciones de los mismos, que no se entrecruzan con R505;

en la que el compuesto es degradable in vivo y la estructura de los compuestos no es C-C-E-L-A-C-N-P-A-C-T-G-A.

- 30 En algunas realizaciones preferidas, R501 es preferiblemente 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilo, uno o más de 1-50 alquilo sustituidos, uno o más de 1-50 arilo, uno o más de 1-50 arilo sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilo, uno o más de 1-50 alquilarilo sustituidos o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R501 es 0-20 aminoácidos. En algunas realizaciones, R501 es menor de 1000 Da. En algunas realizaciones, R501 es Y, NTFY, SSSNY, SSDWDY, ID, PN o QE.

- 40 En algunas realizaciones preferidas, R502 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], o grupos arilo, alquilo y arilalquilo que pueden entrecruzarse o no con Cys10 (R506). En algunas realizaciones, R502 es 2-carboxi-3-bromopiridina, ácido 2-bromobenzoico o ácido 2-bromociclohexanoico. R502 es preferiblemente C entrecruzada con R506, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R506 por un ligamiento Carba cualquier aa o mimético sin entrecruzamiento.

- 45 En algunas realizaciones preferidas, R503 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys14 (R508) a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente) o un mimético de aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R503 es preferiblemente C entrecruzada con C en R508 o cualquier otro resto entrecruzado con R508.

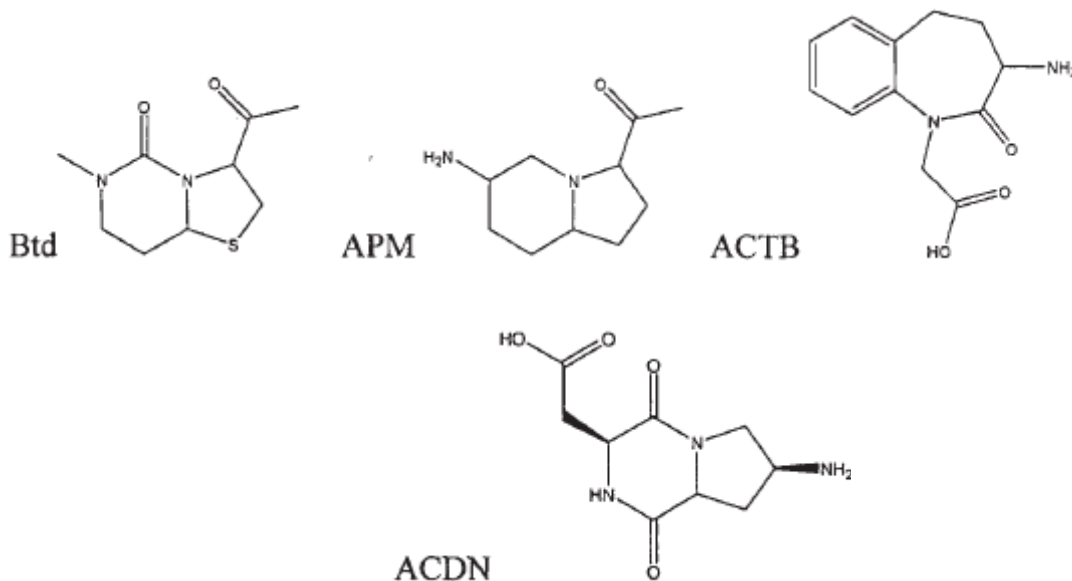
- 50 En algunas realizaciones preferidas, R504 es un solo aminoácido (de todos los tipos), dipéptido, mimético de dipéptido y ligamiento de cadena, particularmente estructuras con 4-8 átomos que cubren el hueco entre R503 y R505, lo más preferiblemente estructuras con 6 átomos que cubren el hueco entre R503 y R505. Son aminoácidos preferidos para R504 sarcosina, ornitina y lisina. Son reemplazos aminoacídicos preferidos de Glu7 Gln, Gly, Ser, Ala, Pro, Asp, Asn y ácido L-octahidroindol-2-carboxílico y sus análogos de N-alquilo, hidroxilo o N-arilo. Son reemplazos aminoacídicos preferidos de Leu8 Ile, norleucina, Met, Val, Phe, Trp, Tyr, Gln, Gly, Ala, Pro y ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo. R504 es preferiblemente un dipéptido tal como E-L o E-N-metil-Leu.

- 60 En algunas realizaciones preferidas, R505 es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente los hidrófobos o neutros, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala, Thr, Leu, N(Me)-Leu, Phe y cisteína bloqueada, serina y treonina o un mimético de aminoácido tal como ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. En algunas realizaciones preferidas, R505 puede comprender aminoácidos o moléculas orgánicas con una hidrofobicidad de al menos -2,0 (el ácido glutámico es el AA nativo menor con un valor de -1,22), y preferiblemente un valor mayor de 0, y más preferiblemente un valor mayor de 1. La hidrofobicidad se determina por el método de

Sweet y Eisenberg (Sweet R.M., Eisenberg D., J. Mol. Biol. 171: 479-488 (1983)). R505 es preferiblemente A L, T, F, V, I, Y, N-metil-Leu, N-metil-Ala y N-metil-Val.

En algunas realizaciones preferidas, R506 es un solo aminoácido (de todos los tipos) o un análogo de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo de uno o un mimético de aminoácido tal que limita los ángulos diédricos de la cadena lateral a configuraciones favorables. R506 es preferiblemente C entrecruzada con R502, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R502 por un ligamiento Carba o cualquier aminoácido o mimético sin entrecruzamiento.

En algunas realizaciones preferidas, R507 es un mimético de dipéptido tal como biciclo-L-serilprolina, Btd, APM, ACTB o ACDN.



En algunas realizaciones, R507 es X-Y-Z en la que:

X es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Asn, Asp, Ala, His, Gln, Gly, β -alanina), o uno corto (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo o aminoácidos sintéticos, preferiblemente isoasparagina o β -alanina.

Y es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Pro, Ile, Ala, Val (tanto D como L) y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo; aminoácidos sintéticos tales como homoPro, ácido nipecótico, ácido isonipecótico, Oic, Tic, Aib, aminobenzoato, carboxipiperidina, carboxilato de azetidina y ácido aminociclopentenocarboxílico o miméticos aminoácidos tales como ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico que limitan los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables.

Z es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente sin cadena lateral (Gly, β -alanina), o una corta (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala y Gly.

R507 es preferiblemente un tripéptido N-P-A.

En algunas realizaciones preferidas, R508 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys6 (R503) a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente) o un mimético de aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R508 es preferiblemente C entrecruzada con C en R503 o cualquier otro resto entrecruzado con R503.

En algunas realizaciones preferidas, R509 es preferiblemente escindible o degradable de otro modo in vivo de tal modo que se convierte de un compuesto de la invención en un agonista. Son ejemplos de colas escindibles NPAAAGCacmY y ST11-18 con un cambio en 17 para retirar la función de entrecruzamiento.

La presente divulgación se refiere también a compuestos que son compuestos de bucle B de la invención que son compuestos de bucle B que tienen colas no degradables. La presente divulgación se refiere a compuestos que tienen la fórmula (VI):

(VI) R601- R602 - R603 - R604 - R605 - R606 - R607- R608 - R609

en la que:

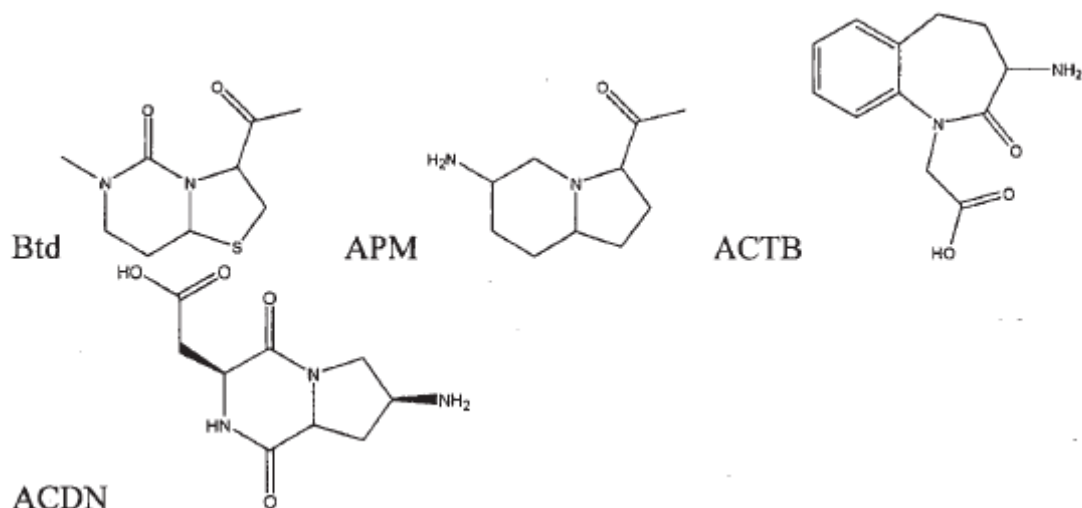
- 5 R601 es una combinación de 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos;
- 10 R602 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido en el que R602 puede entrecruzarse con R606;
- R603 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R608;
- 15 R604 es uno o dos aminoácidos naturales, uno o dos aminoácidos bloqueados, uno o dos aminoácidos sintéticos, uno o dos aminoácidos derivatizados, uno o dos miméticos de aminoácidos o un mimético de dipéptido o combinaciones de los mismos, en el que:
- 20 R604 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R603 con R605;
- R605 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que no se entrecruza con R609;
- 25 R606 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido, en el que R606 puede entrecruzarse con R602;
- R607 es uno, dos o tres aminoácidos naturales, uno, dos o tres aminoácidos bloqueados, uno, dos o tres miméticos de aminoácidos o un mimético de tripéptido o combinaciones de los mismos, en el que R607 forma un giro beta que
- 30 liga R606 con R608;
- R608 es un aminoácido natural, aminoácido bloqueado, aminoácido sintético, aminoácido derivatizado o mimético de aminoácido que se entrecruza con R603;
- 35 R609 está ausente o es 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos, que no se entrecruza con R505; y no son degradables in vivo.
- 40 En algunas realizaciones preferidas, R601 es preferiblemente 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos o combinaciones de los mismos. En algunas
- 45 realizaciones, R601 es 0-20 aminoácidos. En algunas realizaciones, R601 es menor de 1000 Da. En algunas realizaciones, R601 es Y, NTFY, SSSNY, SSDWDY, ID, PN o QE.
- En algunas realizaciones preferidas, R602 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR2)_n-S$ o $-(CR2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], o grupos arilo, alquilo y arilalquilo que pueden entrecruzarse o no con Cys10 (R606). En algunas realizaciones, R602 es 2-carboxi-3-bromopiridina, ácido 2-bromobenzoico o ácido 2-bromociclohexanoico. R602 es preferiblemente C entrecruzada con R606, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R606 por un ligamiento Carba cualquier aa o mimético sin entrecruzamiento.
- 50 En algunas realizaciones preferidas, R603 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR2)_n-S$ o $-(CR2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys14 (R608) a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente) o un mimético de aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R603 es preferiblemente C entrecruzada con C en R608 o cualquier otro resto entrecruzado con R608.
- 55 En algunas realizaciones preferidas, R604 es un solo aminoácido (de todos los tipos), dipéptido, mimético de dipéptido y ligamiento de cadena, particularmente estructuras con 4-8 átomos que cubren el hueco entre R603 y R605, lo más preferiblemente estructuras con 6 átomos que cubren el hueco entre R603 y R605. Son aminoácidos preferidos para R604 sarcosina, ornitina y lisina. Son reemplazos aminoacídicos preferidos de Glu7 Gln, Gly, Ser, Ala, Pro, Asp, Asn y ácido L-octahidroindol-2-carboxílico y sus análogos de N-alquilo, hidroxilo o N-arilo. Son reemplazos aminoacídicos preferidos de Leu8 Ile, norleucina, Met, Val, Phe, Trp, Tyr, Gln, Gly, Ala, Pro y ácido L-
- 60
- 65

1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo. R604 es preferiblemente un dipéptido tal como E-L o E-N-metil-Leu.

En algunas realizaciones preferidas, R605 es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente los hidrófobos o neutros, y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala, Thr, Leu, N(Me)-Leu, Phe y cisteína bloqueada, serina y treonina o un mimético aminoácido tal como ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. En algunas realizaciones preferidas, R605 puede comprender aminoácidos o moléculas orgánicas con una hidrofobicidad de al menos -2,0 (el ácido glutámico es el AA nativo menor con un valor de -1,22), y preferiblemente un valor mayor de 0, y más preferiblemente un valor mayor de 1. La hidrofobicidad se determina por el método de Sweet y Eisenberg (Sweet R.M., Eisenberg D., J. Mol. Biol. 171: 479-488 (1983)). R605 es preferiblemente A L, T, F, V, I, Y, N-metil-Leu, N-metil-Ala y N-metil-Val.

En algunas realizaciones preferidas, R606 es un solo aminoácido (de todos los tipos) o un análogo de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo de uno o un mimético de aminoácido tal que limita los ángulos diédricos de la cadena lateral a configuraciones favorables. R606 es preferiblemente C entrecruzada con R602, C bloqueada tal como Cmob, entrecruzada con R602 por un ligamiento Carba o cualquier aminoácido o mimético sin entrecruzamiento.

En algunas realizaciones preferidas, R607 es un mimético de dipéptido tal como biciclo-L-serilprolina, Btd, APM, ACTB o ACDN.



En algunas realizaciones, R607 es X-Y-Z en la que:

X es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Asn, Asp, Ala, His, GlnGly, β -alanina), o uno corto (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo o aminoácidos sintéticos, preferiblemente isoasparagina o β -alanina.

Y es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente Pro, Ile, Ala, Val (tanto D como L) y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo; aminoácidos sintéticos tales como homoPro, ácido nipecótico, ácido isonipecótico, Oic, Tic, Aib, aminobenzoato, carboxipiperidina, carboxilato de azetidina y ácido aminociclopentenocarboxílico o miméticos aminoácidos tales como ácido L-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico que limitan los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables.

Z es un solo aminoácido (de todos los tipos), preferiblemente sin cadena lateral (Gly, β -alanina), o una corta (Ala, Ser, Thr, Asp), y sus análogos de N-alquilo, N-hidroxilo o N-arilo, más preferiblemente Ala, N(Me)-Ala y Gly.

R607 es preferiblemente un tripéptido N-P-A.

En algunas realizaciones preferidas, R608 es un análogo de cadena lateral de cisteína $[-(CR_2)_n-S$ o $-(CR_2)_n-H$; en el que n es C1-C10, R es cualquier átomo y H es un grupo reactivo], un aminoácido α , β o γ capaz de formar un entrecruzamiento con Cys6 (R503) a través de un grupo funcional de cadena lateral (véanse las cadenas laterales anteriormente), un mimético aminoácido tal como 2-carboxi-3-tiopiperidina, que limita los ángulos diédricos o la cadena lateral a configuraciones favorables. R608 es preferiblemente C entrecruzada con C en R603 o cualquier otro resto entrecruzado con R603.

En algunas realizaciones preferidas, R609 no es degradable in vivo de tal modo que no se convierte de un compuesto de la invención en un agonista. Son ejemplos de colas escindibles aminoácidos orgánicos o de origen no natural.

Los compuestos pueden producirse sintética o recombinantemente. Los péptidos y composiciones conjugadas o porciones de las mismas que son péptidos pueden prepararse usando la técnica sintética en fase sólida descrita inicialmente por Merrifield, en J. Am. Chem. Soc., 15:2149-2154 (1963). Pueden encontrarse otras técnicas de síntesis peptídica, por ejemplo, en M. Bodanszky et al., (1976) "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, 2ª Ed.; Kent and Clark-Lewis en "Synthetic Peptides in Biology and Medicine", pág. 295-358, eds. Alitalo, K., et al. Science Publishers, (Amsterdam, 1985); así como en otros trabajos de referencia conocidos por los especialistas en la materia. Puede encontrarse un sumario de técnicas de síntesis peptídica en J. Stuart y J. D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. (1984). Puede usarse también la síntesis de péptidos mediante métodos en solución como se describe en "The Proteins", vol. II, 3ª Ed., pág. 105-237, Neurath, H. et al., Eds., Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976). Se encontrarán grupos protectores apropiados para uso en dichas síntesis en los textos anteriores, así como en J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Nueva York, N.Y. (1973). En general, estos métodos sintéticos implican la adición secuencial de uno o más residuos aminoácidos o residuos aminoácidos protegidos adecuados a una cadena peptídica creciente. Normalmente, se protege el grupo amino o carboxilo del primer residuo aminoácido por un grupo protector adecuado selectivamente retirable. Se utiliza un grupo protector selectivamente retirable diferente para aminoácidos que contienen un grupo lateral reactivo, tales como lisina.

Usando una síntesis en fase sólida como ejemplo, el aminoácido protegido o derivatizado se enlaza con un soporte sólido a través de su grupo carboxilo o amino desprotegido. Se retira entonces selectivamente el grupo protector del grupo amino o carboxilo y se mezcla el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) adecuadamente protegido y se hace reaccionar con el residuo ya enlazado al soporte sólido. Se retira entonces el grupo protector del grupo amino o carboxilo de este residuo aminoácido recién añadido y se añade entonces el siguiente aminoácido (adecuadamente protegido) y así. Después de ligar todos los aminoácidos deseados en la secuencia apropiada, se retira cualquier grupo protector de grupos terminales y laterales restantes (y el soporte sólido) secuencial o simultáneamente, proporcionando el péptido final. El péptido de la invención está preferiblemente desprovisto de aminoácidos bencilados o metilbencilados. Dichos restos de grupo protector pueden usarse en el transcurso de la síntesis, pero se retiran antes de usar los péptidos. Pueden ser necesarias reacciones adicionales, como se describen en otro lugar, para formar ligamientos intramoleculares para limitar la conformación.

Según algunas realizaciones de la invención, los compuestos de la invención se conjugan con un resto detectable, haciéndolos particularmente útiles como agentes imagenológicos o reactivos de ensayo de diagnóstico. Los restos detectables incluyen restos radiactivos así como no radiactivos.

Los ejemplos de restos radiactivos incluyen la sustitución de átomos del compuesto por un isótopo radiactivo de dichos átomos. Como alternativa, el resto radiactivo puede ser un radionucleido o un compuesto radiactivo que está conjugado con el compuesto directamente o mediante el uso de un ligador. Los ejemplos de compuestos no radiactivos incluyen un compuesto de GCC de la invención conjugado con un resto detectable no radiactivo. En algunas realizaciones, el compuesto de GCC de la invención está ligado a un ligador que forma un enlace o complejo con un resto detectable, incluyendo un compuesto radiactivo que esta conjugado con el compuesto directamente o mediante el uso de un ligador.

Los ejemplos de restos que pueden estar conjugados con los compuestos de la invención incluyen un radionucleido tal como, por ejemplo, ¹²⁵I, ⁴³K, ⁵⁷Fe, ⁶⁷Co, ⁶⁷Cu, ⁶⁸Ga, ⁷⁷Br, ⁸¹Rb, ⁸¹MKr, ⁸⁷MSr, ⁹⁹MTc, ¹¹¹In, ¹¹³MIn, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹²⁷Cs, ¹²⁹Cs, ¹³¹I, ¹³²I, ¹⁹⁷Hg, ²⁰³Pb y ²⁰⁶Bi, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹⁰⁹Pd, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁹Au, ²¹¹At, ²¹²Pb y ²¹²Bi, ³²P y ³³P, ⁷¹Ge, ⁷⁷As, ¹⁰³Pb, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹⁹Sb, ¹²¹Sn, ¹³¹Cs, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹¹Os, ¹⁹³MPt, ¹⁹⁷Hg; emisores beta negativos y/o de Auger; enzimas tales como, por ejemplo, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa; marcajes fluorescentes tales como, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluoescamina; metales emisores de fluorescencia tales como ¹⁵²Eu u otros de la serie lantánida; metales que usan grupos quelantes metálicos como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); marcajes quimioluminiscentes tales como, por ejemplo, luminol, isoluminol, éster de acridinio aromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato y marcajes bioluminiscentes tales como, por ejemplo, luciferina, luciferasa y aecuatorina. Los ejemplos incluyen también productos quimioterapéuticos tales como, por ejemplo, metotrexato (ametofterina), doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, arabinósido de citosina, etopósido, 5-4-fluorouracilo, melfalán, clorambucilo y otras mostazas nitrogenadas (por ejemplo, ciclofosfamida), cisplatino, vindesina (y otros alcaloides de la vinca), mitomicina y bleomicina. Otros productos quimioterapéuticos incluyen: purotioina (oligopéptido de harina de cebada), macromomicina, derivados de 1,4-benzoquinona y trenimón; toxinas tales como, por ejemplo, ricina, cadena A de ricina (toxina de ricina), exotoxina de Pseudomonas (PE), toxina de la difteria (DT), fosfolipasa C de Clostridium perfringens (PLC), ribonucleasa pancreática bovina (BPR), proteína antivirica de fitolaca (PAP), abrina, cadena A de abrina (toxina de abrina), factor de veneno de cobra (CVF), gelonina (GEL), saporina

(SAP), modicina, viscumina y volkensina; profármacos inactivos que pueden convertirse por la enzima en un fármaco activo tales como un profármaco, tal como, por ejemplo, fosfato de etopósido, que pueden convertirse en un fármaco activo mediante una enzima tal como, por ejemplo, fosfatasa alcalina/fosfato de etopósido; agentes radiosensibilizadores tales como, por ejemplo, nitroimidazoles, metronidazol y misonidazol; radionucleidos útiles como toxinas en radioterapia tales como, por ejemplo, ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb y ^{212}Bi , ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}MPT , ^{197}Hg ; y todos los emisores beta negativos y/o de Auger; metales pesados tales como quelatos de hierro, quelatos de gadolinio o manganeso; emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio; radionucleidos útiles en procedimientos de imagenología tales como, por ejemplo, ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , ^{81}MKr , ^{87}MSr , ^{99}MTc , ^{111}In , ^{113}Mn , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi . Los ejemplos adicionales incluyen agentes fotodinámicos tales como fluoróforos o porfirinas. La porfirina puede incluir derivado de hematoporfirina (HPD) y porfímero de sodio (Photofrin™). Es una segunda generación de fotosensibilizadores la BPD-verteporfina. En algunas realizaciones, el fluoróforo es tetrametilrotamina.

15 Composiciones de la invención

Según algunas realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden compuestos conjugado o no conjugados así como kits.

- 20 Las composiciones que comprenden compuestos conjugados útiles para imagenología o terapia in vivo se proporcionan como composiciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, los compuestos se proporcionan como productos farmacéuticos adaptados para administración oral. En dichas realizaciones, la composición puede estar en forma de un comprimido, cápsula o líquido. En algunas realizaciones, el comprimido o cápsula puede estar recubierto entéricamente o adaptado de otro modo para pasar el estómago intacto para suministro al intestino.
- 25 En algunas realizaciones, las composiciones son composiciones estériles exentas de pirógenos particularmente adecuadas como inyectables. Algunas puede estar adaptadas para aplicación tópica tales como pulverizadores en composiciones de imagenología. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden los compuestos de la invención en combinación con un liposoma que comprende un compuesto terapéutico. En algunas realizaciones preferidas, el compuesto de la invención se proporciona en el exterior de un liposoma que comprende un producto quimioterapéutico, producto de terapia génica, compuesto anticodificante, toxina o sustancia radiactiva.
- 30

En algunas realizaciones, el compuesto se proporciona en una composición adaptada para uso como reactivo in vitro/ex vivo tal como un reactivo de diagnóstico.

- 35 La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse por un especialista en la materia. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences", A. Osol, un texto de referencia estándar en este campo. Al llevar a cabo los métodos de la presente invención, pueden usarse compuestos no conjugados y conjugados de la presente invención solos o en combinación con otros agentes de diagnóstico, terapéuticos o adicionales. Dichos agentes adicionales incluyen excipientes tales como colorantes,
- 40 agentes estabilizantes, agentes osmóticos y agentes antibacterianos.

- Para administración parenteral, los péptidos de la invención pueden formularse, por ejemplo, como solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Son ejemplos de dichos vehículos agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y seroalbúmina humana al 5 %. Pueden usarse también liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas usadas comúnmente. Las composiciones se liberan de pirógenos mediante técnicas usadas comúnmente. Por ejemplo, se prepara una composición parenteral adecuada para administración por inyección disolviendo 1,5 % en peso de ingrediente activo en solución de cloruro de sodio al 0,9 %.
- 45
- 50

- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier medio que posibilite al agente activo alcanzar las células diana. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, los modos de administración oral, tópica, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal. Los compuestos pueden administrarse individualmente o en combinación con otros compuestos. Los compuestos de la invención se administran preferiblemente con un portador farmacéuticamente aceptable seleccionado basándose en la vía de administración seleccionada y en la práctica farmacéutica estándar.
- 55

Métodos de diagnóstico, imagenología y tratamiento de cáncer

- 60 La presente invención se refiere a compuestos y a métodos para imagenología in vivo y al uso de los compuestos de la invención en métodos para el tratamiento de tumores originarios del canal alimentario, particularmente esófago de Barrett, tumores de estómago y esofágicos primarios y metastáticos y tumores colorrectales metastáticos.

- 65 Los carcinomas derivados de células colorrectales, estómago o esófago expresan GCC. La expresión de GCC por dichos tumores posibilita que esta proteína sea un biomarcador específico de la presencia de células cancerosas en

tejidos extraintestinales y sangre. Es más, esta característica permite la detección de GCC usando los compuestos de la invención en un ensayo de diagnóstico para diagnosticar y estadificar pacientes con cáncer colorrectal, de estómago y esofágico y hacer seguimiento a pacientes después de cirugía para comprobación de enfermedad recurrente en su sangre, así como para detectar cánceres colorrectal, de estómago y esofágico. Además, la GCC puede orientarse por varias realizaciones de la invención para suministrar el agente activo, tal como un agente detectable o un producto quimioterapéutico, a células tumorales in vivo.

La detección de la expresión de GCC empleando técnicas moleculares puede emplearse para diagnosticar y estadificar pacientes, hacer seguimiento de la recurrencia después de cirugía y/o remisión y, potencialmente, cribar en gente normal el desarrollo de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico.

En individuos que padecen cáncer colorrectal, las células cancerosas derivan a menudo de células que producen y exhiben GCC y estas células cancerosas siguen produciendo GCC. Se ha observado que se expresa GCC por células de cáncer colorrectal. Igualmente, se expresa GCC por células de cáncer de estómago y esofágico.

La expresión de GCC por células de tumor colorrectal proporciona una diana detectable para cribado, monitorización y estadificación in vitro, así como una diana para el suministro in vivo de composiciones conjugadas que comprenden agentes activos para imagenología y tratamiento.

La expresión de GCC por células de tumor de estómago y esofágico proporciona una diana detectable para cribado, monitorización y estadificación in vitro, así como una diana para el suministro in vivo de composiciones conjugadas que comprenden agentes activos para imagenología y tratamiento.

La expresión de GCC por células esofágicas es indicativa de esófago de Barrett. La GCC proporciona una diana detectable para cribado, monitorización y estadificación in vitro, así como una diana para el suministro in vivo de composiciones conjugadas que comprenden agentes activos para imagenología y tratamiento.

Usos preferidos

Los compuestos según la invención que son compuestos de GCC de la invención se unen a GCC pero no activan la ruta de señalización de GCC. En consecuencia, dichos compuestos previenen la diarrea en seres humanos que se induce por organismos productores de ST, lo que es especialmente relevante en países en desarrollo donde dichos organismos son comunes. Al administrar los compuestos profilácticamente de forma regular, dichos compuestos pueden usarse para prevenir la diarrea y el retraso de crecimiento que aparecen en niños de países en desarrollo debido a diarrea crónica inducida por ST. Los compuestos son particularmente útiles para prevenir la diarrea del viajero cuando se toman por individuos que se expondrán a organismos que producen ST, tales como aquellos que viajan a países donde dichos organismos son endémicos. Los compuestos son útiles para prevenir diarrea del ganado y otras enfermedades diarreicas en animales.

Los compuestos son también útiles terapéuticamente. Por ejemplo, los compuestos pueden usarse para tratar diarrea conocida por ser inducida por ST así como diarrea secretora de etiología desconocida. De forma similar, pueden usarse para tratar síndrome del intestino irritable y otras formas de diarrea incluyendo, pero sin limitación, diarrea asociada a enfermedad inflamatoria intestinal, esprúe, etc.

Debido a que los compuestos de fórmula se unen a GCC, pueden usarse para la detección, imagenología o tratamiento de cáncer. Los compuestos pueden usarse en métodos para la detección temprana de transformaciones neoplásicas en el tracto GI superior como ligando para identificar la expresión de GCC. De forma similar, pueden emprenderse el cribado, diagnóstico, estadificación y vigilancia postoperatoria de tumores colorrectales usando compuestos que sirven como ligando para identificar la expresión de GCC. Los compuestos pueden usarse en la orientación de diagnóstico y terapéutica a tumores esofágicos y gástricos primarios y metastásicos y tumores colorrectales metastásicos como ligando para GCCm y para facilitar la recuperación intestinal del ataque, por ejemplo, la adaptación intestinal, en la que el epitelio requiere regeneración incluyendo, pero sin limitación, por ataque isquémico, ataque químico, quimioterapia, traumatismo y cirugía.

Los compuestos según la invención que son agonistas de GCC se unen a GCC y activan la ruta de señalización de GCC. En consecuencia, dichos compuestos tratan el esófago de Barrett así como el cáncer de estómago y esofágico primario y metastásico así como el cáncer metastásico. Los compuestos son útiles terapéuticamente solos o en combinación con otros agentes terapéuticos.

Debido a que los compuestos de fórmula se unen a GCC, pueden usarse para la detección, imagenología o tratamiento de cáncer. Los compuestos pueden usarse en métodos para la detección temprana de transformaciones neoplásicas en el tracto GI superior como ligando para identificar la expresión de GCC. De forma similar, pueden emprenderse el cribado, diagnóstico, estadificación y vigilancia postoperatoria de tumores colorrectales usando compuestos que sirven como ligando para identificar la expresión de GCC. Los compuestos pueden usarse en la orientación de diagnóstico y terapéutica a tumores esofágicos y gástricos primarios y metastásicos y tumores colorrectales metastásicos como ligando para GCCm y para facilitar la recuperación intestinal del ataque, por

ejemplo, la adaptación intestinal, en la que el epitelio requiere regeneración incluyendo, pero sin limitación, por ataque isquémico, ataque químico, quimioterapia, traumatismo y cirugía.

Diagnóstico in vitro

Según algunas realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones, kits y métodos in vitro para el cribado, diagnóstico y análisis de pacientes y muestras de pacientes para detectar pruebas de la expresión de GCC por células fuera del tracto gastrointestinal, en los que la expresión de GCC puede sugerir cáncer colorrectal metastasizado o cáncer de estómago o esofágico primario o metastásico. En pacientes sospechosos de tener cáncer colorrectal metastasizado o cáncer de estómago o esofágico primario o metastásico, la prueba de expresión de GCC por células fuera del tracto intestinal es indicativa de cáncer colorrectal metastasizado o cáncer de estómago o esofágico primario o metastásico y puede usarse en el diagnóstico, monitorización y estadificación de dichos pacientes. Además, la presente invención se refiere a métodos, composiciones y kits útiles en el cribado in vitro y el análisis de pacientes y muestras de pacientes para detectar pruebas de la expresión de GCC por células tumorales fuera del tracto intestinal, en los que la presencia de células que expresan GCC sugiere o confirma que un tumor es de origen de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico. En un aspecto adicional de la invención, se proporcionan composiciones, kits y métodos que son útiles para visualizar células de cáncer colorrectal metastasizadas o de cáncer de estómago o esofágico primario o metastásico.

Pueden usarse composiciones, métodos y kits de cribado y diagnóstico in vitro en la monitorización de individuos que están en grupos de alto riesgo de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico tales como aquellos que se han diagnosticado con enfermedad localizada y/o enfermedad metastasizada y/o aquellos que están ligados genéticamente a la enfermedad. Pueden usarse composiciones, métodos y kits de cribado y diagnóstico in vitro en la monitorización de individuos que están experimentando y/o se han tratado por cáncer colorrectal, de estómago o esofágico primario para determinar si el cáncer ha metastasizado. Pueden usarse composiciones, métodos y kits de cribado y diagnóstico in vitro en la monitorización de individuos que están experimentando y/o se han tratado por cáncer colorrectal, de estómago o esofágico primario para determinar si el cáncer se ha eliminado. Pueden usarse composiciones, métodos y kits de cribado y diagnóstico in vitro en la monitorización de individuos que tienen tendencia de otro modo, concretamente individuos que se han identificado como genéticamente predispuestos tal como mediante cribado genético y/o historial familiar. Los avances en la comprensión de la genética y el desarrollo de la tecnología, así como la epidemiología, permiten la determinación de la probabilidad y la evaluación del riesgo que tiene un individuo de desarrollar cáncer de estómago o esofágico. Usando el historial familiar y/o el cribado genético, es posible estimar la probabilidad que un individuo particular tiene de desarrollar ciertos tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal, de estómago o esofágico. Aquellos individuos que se han identificado por estar predispuestos a desarrollar una forma particular de cáncer pueden monitorizarse o cribarse para detectar pruebas de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico. Tras el descubrimiento de dicha prueba, puede emprenderse un tratamiento temprano para combatir la enfermedad. En consecuencia, pueden identificarse los individuos que tienen riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, de estómago o esofágico y pueden aislarse muestras de dichos individuos. La invención es particularmente útil para monitorizar individuos que se ha identificado que tienen un historial médico familiar que incluye parientes que han padecido cáncer colorrectal, de estómago o esofágico. Igualmente, la invención es particularmente útil para monitorizar individuos a los que se ha diagnosticado cáncer colorrectal, de estómago o esofágico y, particularmente, aquellos a los que se han tratado y se han retirado tumores y/o experimentan de otro modo remisión, incluyendo aquellos que se han tratado por cáncer colorrectal, de estómago o esofágico.

Las composiciones, métodos y kits de cribado y diagnóstico in vitro pueden usarse en el análisis de tumores. La expresión de GCC es un marcador del tipo celular y sugiere que el origen de un adenocarcinoma de origen no confirmado puede ser de tumores colorrectal, de estómago o esofágico. La detección de la expresión de GCC puede usarse también para ayudar al diagnóstico inicial de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico o para confirmar dicho diagnóstico. Los tumores que se cree que son de origen colorrectal, de estómago o esofágicos pueden confirmarse como tales usando las composiciones, métodos y kits de la invención.

Las composiciones, kits y métodos de cribado y diagnóstico in vitro de la invención pueden usarse para analizar muestras de tejido del estómago o esófago para identificar cáncer de estómago o esófago primario.

Las composiciones, kits y métodos de cribado y diagnóstico in vitro de la invención pueden usarse para analizar muestras de tejido del colon para detectar la cantidad de invasión por cáncer colorrectal primario en el tejido intestinal.

Según la invención, se proporcionan compuestos que se unen a la proteína GCC. El tejido normal en el cuerpo no tiene proteína GCC, excepto las células del tracto intestinal. La expresión de GCC es un marcador del tipo celular y es útil en la identificación de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico en muestras extraintestinales.

En algunas realizaciones de la invención, pueden cribarse muestras de tejido no colorrectal y de fluido o muestras de tumor para identificar la presencia o ausencia de proteína GCC. La presencia de GCC en muestras de tejido no colorrectal y de fluido o en células de muestras de tejido no colorrectal sugiere un posible cáncer de estómago o

esofágico. La presencia de GCC en una muestra de tumor o en células tumorales sugiere que el tumor puede ser de origen colorrectal, de estómago o esofágico.

Las muestras pueden obtenerse de tejido extraído o de material de biopsia incluyendo biopsia de aguja. Puede congelarse la preparación de sección de tejido para patología quirúrgica y prepararse usando técnicas estándares. Se efectúan ensayos de unión a secciones de tejido en células fijadas. Se contempla también que puedan cribarse muestras de tumor de fluidos corporales tales como muestras de sangre, orina, líquido linfático, líquido cerebroespinal, líquido amniótico, fluido vaginal, semen y heces, para determinar si dichos tumores son de origen colorrectal, de estómago o esofágicos.

Pueden obtenerse muestras de tejido no colorrectal de cualquier tejido excepto del tracto colorrectal, concretamente el tracto intestinal por debajo del intestino delgado (concretamente, el intestino grueso (colon), incluyendo ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y colon sigmoide y recto) y adicionalmente duodeno e intestinal delgado (yeyuno e ileon). Las células normales de todos los tejidos excepto los del tracto colorrectal no expresan GCC. Por tanto, si se detecta proteína GCC en muestras no colorrectales, se sugiere la posible presencia de células de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico. En algunas realizaciones preferidas, las muestras de tejido son de nódulos linfáticos.

Las muestras de tejido pueden obtenerse mediante técnicas quirúrgicas estándares incluyendo el uso de agujas de biopsia. Un especialista en la materia apreciará fácilmente la variedad de muestras de ensayo en que puede examinarse la GCC y reconocerá los métodos de obtención de muestras de tejido.

Los ejemplos de muestras de fluidos corporales incluyen sangre, orina, líquido linfático, líquido cerebroespinal, líquido amniótico, fluido vaginal y semen. En algunas realizaciones preferidas, se usa sangre como muestra de fluido corporal. Pueden aislarse células de la muestra de fluido tal como por centrifugación. Un especialista en la materia apreciará fácilmente la variedad de muestras de ensayo en que puede examinarse la GCC. Las muestras de ensayo pueden obtenerse mediante métodos tales como extraer fluido con una jeringuilla o una torunda. Un especialista en la materia reconocerá fácilmente otros métodos de obtención de muestras de ensayo.

En un ensayo que usa una muestra de sangre, el plasma sanguíneo puede separarse de las células sanguíneas. Puede cribarse en el plasma sanguíneo la GCC, incluyendo proteínas truncadas que se liberan en la sangre cuando se escinden una o más GCC o se desprenden de células tumorales. En algunas realizaciones, se criba en fracciones de células sanguíneas la presencia de células de tumor colorrectal, de estómago o esofágico. En algunas realizaciones, se criban los linfocitos presentes en la fracción de células sanguíneas mediante lisado de las células y detección de la presencia de proteína GCC, que puede estar presente como resultado de la presencia de cualquier célula de tumor de estómago o esofágico que pueda haberse envuelto por la célula sanguínea.

En algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona métodos de detección de la presencia de GCC en una muestra usando compuestos de la invención como ligando detectable de GCC. Los compuestos de la invención usados en este ensayo pueden usarse como reactivos de investigación así como productos de diagnóstico, puesto que se realiza una considerable investigación de laboratorio en la que debe detectarse la presencia de GCC. El ensayo de unión a GCC usa un compuesto detectable para unirse a cualquier GCC presente y por tanto indicar la presencia del receptor en una muestra.

La presente invención se refiere también a métodos de identificación de individuos que padecen cáncer colorrectal, de estómago o esofágico mediante la detección de la presencia de GCC en una muestra de tumor.

El ensayo de unión a GCC puede efectuarse fácilmente por los especialistas en la materia usando materiales de partida fácilmente disponibles. Los ensayos de unión a GCC pueden efectuarse de una variedad de modos, pero cada uno esencialmente identifica si la proteína GCC está presente o no en una muestra determinando si un compuesto detectable se une o no a un receptor en una muestra. Brevemente, el ensayo consiste en incubar una muestra con una concentración constante de compuesto de la invención tal como 1×10^{-10} M a 5×10^{-10} M de compuesto de la invención marcado con ^{125}I . Como control, se incuba una preparación duplicada de muestra conocida por contener GCC con una concentración duplicada de compuesto de la invención marcado con ^{125}I . Se incuban los ensayos hasta equilibrio (por ejemplo, 2 horas) y se analiza la muestra para determinar si el compuesto de la invención con ^{125}I está unido al material de la muestra. Se pasa el compuesto de la invención con ^{125}I /muestra a través de un filtro que es capaz de permitir al compuesto de la invención con ^{125}I pasar a su través pero incapaz de permitir a GCC pasar a su través. Por tanto, si está presente GCC en la muestra, se unirá al compuesto de la invención con ^{125}I , que se atrapará entonces en el filtro. La detección del compuesto de la invención con ^{125}I en el filtro indica la presencia de GCC en la muestra. En algunas realizaciones preferidas, el filtro es papel de filtro de vidrio Whitman GFB. Los controles incluyen muestras que es conocido que contienen GCC, por ejemplo membranas intestinales de intestino de rata, intestino humano, células T84, proteína GCC aislada o células que expresan una secuencia nucleotídica clonada que codifica GCC.

Los compuestos de la invención pueden prepararse rutinariamente mediante cualquiera de las siguientes técnicas conocidas. Además de conjugarse con ^{125}I , los compuestos de la invención pueden ser detectables uniéndolos a

otros radionucleidos tales como: ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , ^{81}MKr , ^{87}MSr , ^{99}MTc , ^{111}In , ^{113}MIn , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb y ^{212}Bi , ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}MPT , ^{197}Hg , así como

todos los emisores beta negativos y/o de Auger o uniéndolos a otros marcajes tales como fluoresceína o enzimas. Cada uno de los medios de marcaje descritos anteriormente para marcar detectablemente anticuerpos puede adaptarse para marcar compuestos de la invención y se considera que se describen como tales en la presente memoria.

El compuesto de la invención puede marcarse detectablemente mediante ligamiento con una enzima. La enzima, cuando se expone posteriormente a su sustrato, reacciona con el sustrato y genera un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar detectablemente anticuerpos incluyen, pero sin limitación, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Un especialista en la materia reconocería fácilmente otras enzimas que pueden usarse también. Es también posible marcar el compuesto con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescente se expone a luz de la longitud de onda apropiada, puede detectarse su presencia debido a su fluorescencia. Entre los compuestos de marcaje fluorescente más comúnmente usados están isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficeitrina, ficeocianina, aloficeocianina, o-ftaldehído y fluorescamina. Un especialista en la materia reconocería fácilmente otros compuestos fluorescentes que pueden usarse también. Los compuestos de la invención pueden marcarse detectablemente también usando metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu u otros de la serie lantánida. Estos metales pueden enlazarse con el anticuerpo específico de proteína usando grupos quelantes metálicos como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Un especialista en la materia reconocería fácilmente otros metales emisores de fluorescencia así como otros grupos quelantes metálicos que pueden usarse también. Los compuestos de la invención pueden marcarse detectablemente también mediante acoplamiento con un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado con quimioluminiscencia se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Son ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles luminol, isoluminol, éster de acridinio aromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato. Un especialista en la materia reconocería fácilmente otros compuestos quimioluminiscentes que pueden usarse también. Igualmente, puede usarse un compuesto bioluminiscente para marcar anticuerpos. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en sistemas biológicos en que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Son compuestos bioluminiscentes importantes con fines de marcaje luciferina, luciferasa y aecurina. Un especialista en la materia reconocería fácilmente otros compuestos bioluminiscentes que pueden usarse también.

La detección del compuesto de la invención puede lograrse mediante un contador de centelleo, por ejemplo si el marcaje detectable es un emisor gamma radiactivo. Como alternativa, la detección puede lograrse mediante un fluorómetro, por ejemplo si el marcaje es un material fluorescente. En el caso de un marcaje enzimático, la detección puede lograrse mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato de la enzima. La detección puede lograrse también mediante comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de forma similar. Un especialista en la materia reconocería fácilmente otros métodos apropiados de detección que pueden usarse también.

Pueden efectuarse controles positivos y negativos en que se añaden cantidades conocidas de proteína GCC y sin proteína GCC, respectivamente, a ensayos que se están efectuando en paralelo con el ensayo de medida. Un especialista en la materia tendría el conocimiento necesario para efectuar los controles apropiados. Además, el kit puede comprender instrucciones para efectuar el ensayo. Adicionalmente, el kit puede comprender opcionalmente representaciones o fotografías que representen la apariencia de los resultados positivos y negativos.

Los anticuerpos anti-compuesto de la invención pueden generarse, marcarse detectablemente de la manera descrita anteriormente para marcar compuestos de la invención y usarse para detectar el compuesto de la invención unido a GCC de la muestra. Los anticuerpos anti-compuesto de la invención pueden diseñarse también para inmuno-PCR, inmunoamplificación de ARN, clasificación magnética, etc.

Los kits incluyen envases que comprenden los compuestos detectables de la invención junto con envases que tienen controles positivos y/o negativos, concretamente muestras que contienen GCC y muestras que no contienen GCC, respectivamente. Los compuestos detectables de la invención están preferiblemente marcados. Los componentes adicionales en algunos kits incluyen soporte sólido, tampón e instrucciones para llevar a cabo el ensayo. Adicionalmente, el kit comprende opcionalmente representaciones o fotografías que representan la apariencia de los resultados positivos y negativos.

El ensayo de unión a GCC es útil para detectar GCC en muestras de tejido homogeneizado y muestras de fluido corporal, incluyendo la porción plasmática.

Imagenología y terapia in vivo

Según algunas realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones y métodos in vivo para detección, imagenología o uso en el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico y tumores de estómago o esofágicos primarios y/o metastáticos en un individuo.

Cuando las composiciones conjugadas de la presente invención se administran fuera del tracto intestinal, tal como cuando se administran al sistema circulatorio, permanecen segregadas de las células que revisten el tracto intestinal y se unirán solo a células fuera del tracto intestinal que expresen GCC. Las composiciones conjugadas no se unirán a células normales, sino que se unirán a células de cáncer colorrectal metastásico y células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático. Por tanto, los restos activos de composiciones conjugadas administradas fuera del tracto intestinal se suministran a células que expresan GCC tales como células de cáncer colorrectal metastásico y células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático.

Las composiciones farmacéuticas terapéuticas y de diagnóstico útiles en la presente invención incluyen compuestos conjugados que se orientan específicamente a células que expresan GCC. Estos compuestos conjugados incluyen restos que se unen a GCC que no se unen a células de tejido normal en el cuerpo excepto a células del tracto intestinal, puesto que las células de otros tejidos no expresan GCC.

Al contrario que las células colorrectales normales, las células cancerosas que expresan GCC son accesibles para las sustancias administradas fuera del tracto intestinal, por ejemplo administradas al sistema circulatorio. La única GCC en tejido normal existe en membranas apicales de células de la mucosa intestinal y por tanto aislada eficazmente de los agentes quimioterapéuticos de cáncer y de imagenología orientados administrados fuera del tracto intestinal por la barrera de la mucosa intestinal. Por tanto, pueden orientarse a células de cáncer colorrectal metastásico y cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático compuestos conjugados de la presente invención introduciendo dichos compuestos fuera del tracto intestinal tal como, por ejemplo, administrando composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos conjugados en el sistema circulatorio.

Un especialista en la materia puede identificar a individuos sospechosos de padecer cáncer colorrectal metastásico y cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático. En aquellos individuos diagnosticados con cáncer colorrectal, de estómago o esofágico, no es infrecuente, y en algunos casos es terapia estándar, sospechar metástasis e intentar erradicar agresivamente las células metastasizadas. La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y métodos para imagenología y así se diagnosticarán más definitivamente enfermedad primaria y metastásica. Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden agentes terapéuticos y métodos para orientarse específicamente a y eliminar células de cáncer colorrectal metastásico y células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático. Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden productos terapéuticos y métodos para eliminar específicamente células de cáncer colorrectal metastásico y células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden composiciones conjugadas de la presente invención pueden usarse para diagnosticar o tratar individuos que padecen cáncer colorrectal metastásico y tumores de estómago o esofágicos primarios y/o metastáticos.

La presente invención se basa en el uso de un compuesto de la invención en una composición conjugada. Los compuestos de la invención son esencialmente una porción de la composición conjugada que actúa como ligando de GCC y por tanto se une específicamente a la misma. La composición conjugada incluye también un resto activo que está asociado a los compuestos de la invención; siendo el resto activo un agente activo que es útil para formar imágenes, orientarse a, neutralizar o inactivar la célula.

Según algunos aspectos de la presente invención, los compuestos comprenden el compuesto de la invención ligado con un resto activo que puede ser un agente terapéutico o un agente de imagenología. Un especialista en la materia puede reconocer fácilmente las ventajas de poder orientar específicamente a células cancerosas un compuesto de la invención y conjugar dicho compuesto de la invención con muchos agentes activos diferentes.

Los productos quimioterapéuticos útiles como restos activos que, cuando se conjugan con un compuesto de la invención, se suministran específicamente a células que expresan GCC tales como células de cáncer colorrectal metastásico, células de cáncer de estómago o células de cáncer esofágico, son típicamente pequeñas entidades químicas producidas mediante síntesis química. Los productos quimioterapéuticos incluyen fármacos citotóxicos y citostáticos. Los productos quimioterapéuticos pueden incluir aquellos que tienen otros efectos sobre células tales como la reversión del estado transformado en un estado diferenciado o aquellos que inhiben la replicación celular. Los ejemplos de productos quimioterapéuticos incluyen fármacos citotóxicos o citostáticos comunes tales como, por ejemplo: metotrexato (ametopterina), doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, arabinósido de citosina, etopósido, 5,4-fluorouracilo, melfalán, clorambucilo y otras mostazas nitrogenadas (por ejemplo, ciclofosfamida), cisplatino, vindesina (y otros alcaloides de la vinca), mitomicina y bleomicina. Otros productos quimioterapéuticos incluyen: purotionina (oligopéptido de harina de cebada), macromomicina, derivados de 1,4-benzoquinona y trenimón.

Las toxinas son útiles como restos activos. Cuando se conjuga una toxina con un compuesto de la invención, la composición conjugada se suministra específicamente a una célula que expresa GCC tal como células de cáncer colorrectal metastásico, células de cáncer de estómago o esofágico mediante el compuesto de la invención, y el resto de toxina inactiva la célula. Las toxinas son generalmente productos tóxicos complejos de diversos organismos incluyendo bacterias, plantas, etc. Los ejemplos de toxinas incluyen, pero sin limitación: ricina, cadena A de ricina (toxina de ricina), exotoxina de *Pseudomonas* (PE), toxina de la difteria (DT), fosfolipasa C de *Clostridium perfringens* (PLC), ribonucleasa pancreática bovina (BPR), proteína antivirica de fitolaca (PAP), abrina, cadena A de abrina (toxina de abrina), factor de veneno de cobra (CVF), gelonina (GEL), saporina (SAP), modicina, viscumina y volkensina. Como se discute anteriormente, cuando se emplean toxinas proteicas con péptidos del compuesto de la invención, pueden producirse composiciones conjugadas usando técnicas de ADN recombinante. Brevemente, puede construirse una molécula de ADN recombinante que codifica tanto el compuesto como la toxina en un gen quimérico. Cuando se expresa el gen quimérico, se produce una proteína de fusión que incluye un compuesto de la invención y un resto activo. Las toxinas proteicas son también útiles para formar compuestos conjugados con el compuesto de la invención a través de enlaces no peptídicos.

Además, existen otros enfoques para utilizar agentes activos para el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, pueden producirse composiciones conjugadas que incluyan un compuesto de la invención y un resto activo que es una enzima activa. El compuesto de la invención localiza específicamente la composición conjugada en las células tumorales. Se administra al paciente un profármaco inactivo que puede convertirse por la enzima en un fármaco activo. El profármaco se convierte en un fármaco activo solo por la enzima que está localizada en el tumor. Un ejemplo de un par enzima/profármaco incluye fosfatasa alcalina/fosfato de etopósido. En dicho caso, se conjuga la fosfatasa alcalina con un compuesto de la invención. Se administra el compuesto conjugado y se localiza en la célula cancerosa. Tras el contacto con el fosfato de etopósido (el profármaco), se convierte en fosfato de etopósido en etopósido, un fármaco quimioterapéutico que se incorpora a la célula cancerosa.

Los agentes radiosensibilizadores son sustancias que aumentan la sensibilidad de la células ante la radiación. Los ejemplos de agentes radiosensibilizadores incluyen nitroimidazoles, metronidazol y misonidazol (véase: DeVita, V. T. Jr. en "Harrison's Principles of Internal Medicine", pág. 68, McGraw-Hill Book Co., N.Y. 1983). Se administra el compuesto conjugado que comprende un agente radiosensibilizador como resto activo y se localiza en la célula de cáncer colorrectal metastásico y célula de cáncer de estómago o esofágico primaria y/o metastásico. Tras exposición del individuo a radiación, se "excita" el agente radiosensibilizador y causa la muerte de la célula.

Pueden usarse radionucleidos en composiciones farmacéuticas que son útiles para procedimientos de radioterapia o imagenología. Los ejemplos de radionucleidos útiles como toxinas en radioterapia incluyen: ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb y ^{212}Bi . Otros radionucleidos que se han usado por los especialistas en la materia incluyen: ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}MPt , ^{197}Hg , todos emisores beta negativos y/o de Auger. Algunos radionucleidos preferidos incluyen: ^{90}Y , ^{131}I , ^{211}At y $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$.

Según la presente invención, los restos activos pueden ser un agente de imagenología. Los agentes de imagenología son útiles en procedimientos de diagnóstico así como en procedimientos usados para identificar la localización de células cancerosas. La imagenología puede efectuarse mediante muchos procedimientos bien conocidos por los especialistas en la materia y el agente de imagenología apropiado útil en tales procedimientos puede conjugarse con un compuesto de la invención mediante medios bien conocidos. La imagenología puede efectuarse, por ejemplo, mediante radiogammagrafía, imagenología por resonancia magnética nuclear (RMN) o tomografía computerizada (TAC). Los agentes de imagenología radionucleidos más comúnmente empleados incluyen yodo e indio radiactivos. La imagenología por TAC puede emplear un metal pesado tal como quelatos de hierro. El barrido por IRM puede emplear quelatos de gadolinio o manganeso. Adicionalmente, puede ser posible la tomografía de emisión de positrones (TEP) usando emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio. Los ejemplos de radionucleidos útiles en procedimientos de imagenología incluyen: ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , ^{81}MKr , ^{87}MSr , ^{99}MTc , ^{111}In , ^{113}MIn , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi .

Se prefiere que las composiciones conjugadas sean no inmunogénicas o inmunogénicas a muy bajo nivel. En consecuencia, se prefiere que el compuesto de la invención sea un péptido o no péptido pequeño, poco inmunogénico o no inmunogénico.

Los compuestos de la invención se conjugan con agentes activos mediante una variedad de técnicas bien conocidas fácilmente efectuadas sin experimentación indebida por los especialistas en la materia. La técnica usada para conjugar el compuesto de la invención con el agente activo depende de la naturaleza molecular del compuesto de la invención y el agente activo. Después de conjugar el compuesto de la invención y el agente activo formando una sola molécula, pueden efectuarse ensayos para asegurar que la molécula conjugada retiene las actividades de los restos. El ensayo de unión competitiva descrito anteriormente puede usarse para confirmar que el compuesto de la invención retiene su capacidad de unión como compuesto conjugado. De forma similar, puede ensayarse la actividad del resto activo usando diversos ensayos para cada tipo respectivo de agente activo. Los radionucleidos retienen su actividad, concretamente su radiactividad, independientemente de la conjugación. Con respecto a los

agentes activos que son toxinas, fármacos y agentes orientadores, pueden usarse ensayos estándares para demostrar la actividad de las formas no conjugadas de estos compuestos para confirmar que se ha retenido la actividad.

La conjugación puede lograrse directamente entre el compuesto de la invención y el agente activo o pueden proporcionarse grupos moleculares intermedios ligadores entre el compuesto de la invención y el agente activo. Los ligadores son particularmente útiles para facilitar a conjugación al proporcionar sitios de enlazamiento para cada resto. Los ligadores pueden incluir grupos moleculares adicionales que sirven como espaciadores para separar los restos entre sí para evitar que interfieran con la actividad del otro.

Un especialista en la materia puede conjugar un compuesto de la invención con un fármaco quimioterapéutico usando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, Magerstadt, M. "Antibody Conjugates and Malignant Disease". (1991) CRC Press, Boca Raton, EE.UU., pág. 110-152) enseña la conjugación de diversos fármacos citostáticos con aminoácidos de anticuerpos. Dichas reacciones pueden aplicarse para conjugar fármacos quimioterapéuticos con compuestos de la invención con un ligador apropiado. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos actualmente en uso en el tratamiento de cáncer poseen grupos funcionales que son susceptibles de ligamento químico directamente con proteínas. Por ejemplo, están disponibles grupos amino libres en metotrexato, doxorubicina, daunorubicina, arabinósido de citosina, cisplatino, vindesina, mitomicina y bleomicina, mientras que están disponibles grupos ácido carboxílico libres en metotrexato, melfalán y clorambucilo. Estos grupos funcionales, es decir amino y ácido carboxílico libres, son dianas de una variedad de agentes ligantes homobifuncionales y heterobifuncionales que pueden ligar estos fármacos directamente con el único grupo amino libre de un anticuerpo. Por ejemplo, un procedimiento para ligar compuestos de la invención que tienen un grupo amino libre con agentes activos que tienen un grupo amino libre tales como metotrexato, doxorubicina, daunorubicina, arabinósido de citosina, cisplatino, vindesina, mitomicina y bleomicina, o fosfatasa alcalina o toxina basada en proteína o péptido, emplea ésteres de succinimidilo homobifuncionales, preferiblemente con espaciadores de cadena carbonada tales como suberato de disuccinimidilo (Pierce Co, Rockford, Ill.). En el caso de requerirse un compuesto conjugado escindible, se emplearía el mismo protocolo utilizando (propionato de 3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilo); Pierce Co.).

Para conjugar un compuesto de la invención que es un péptido o proteína con un agente activo basado en péptido tal como una toxina, el compuesto de la invención y la toxina pueden producirse en una sola proteína de fusión mediante síntesis peptídica estándar o tecnología de ADN recombinante, ambas de las cuales pueden efectuarse rutinariamente por los especialistas en la materia. Como alternativa, pueden producirse y/o aislarse dos péptidos, el compuesto de la invención y la toxina basada en péptido, como péptidos separados y conjugarse usando ligadores. Como con las composiciones conjugadas que contienen fármacos quimioterapéuticos, la conjugación del compuesto de la invención y toxinas puede explotar la capacidad de modificar el único grupo amino libre de un compuesto de la invención, conservando la función de unión a receptor de esta molécula.

Un especialista en la materia puede conjugar un compuesto de la invención con un radionucleido usando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, Magerstadt, M. (1991) "Antibody Conjugates And Malignant Disease", CRC Press, Boca Raton, Fla. y Barchel, S. W. y Rhodes, B. H., (1983) "Radioimaging and Radiotherapy", Elsevier, NY NY, enseñan la conjugación de diversos radionucleidos terapéuticos y de diagnóstico con aminoácidos de anticuerpos.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos conjugados de la invención y portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse por un especialista en la materia. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences", A. Osol, un texto de referencia estándar en este campo. Al llevar a cabo los métodos de la presente invención, pueden usarse compuestos conjugados de la presente invención solos o en combinación con otros agentes de diagnóstico, terapéuticos o adicionales. Dichos agentes adicionales incluyen excipientes tales como agentes colorantes, estabilizantes, osmóticos y antibacterianos. Las composiciones farmacéuticas son preferiblemente estériles y exentas de pirógenos.

Las composiciones conjugadas de la invención pueden formularse, por ejemplo, como solución, suspensión o emulsión en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Son ejemplos de dichos vehículos agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y seroalbúmina humana al 5 %. Pueden usarse también liposomas. El vehículo puede contener aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas usadas comúnmente. Por ejemplo, se prepara una composición parenteral adecuada para administración por inyección disolviendo 1,5 % en peso de ingrediente activo en una solución de cloruro de sodio al 0,9 %.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden administrarse como dosis única o en múltiples dosis. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse como agentes terapéuticos individuales o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los usos de la presente invención pueden combinarse con terapias convencionales, que pueden administrarse secuencial o simultáneamente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier medio que posibilite a la composición conjugada alcanzar las células diana. En algunas realizaciones, las vías de administración incluyen aquellas seleccionadas del grupo consistente en administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y local al suministro sanguíneo del órgano en que reside el tumor o directamente al tumor mismo.

Además de en un pulverizador intraoperatorio, los compuestos conjugados pueden suministrarse por vía intratecal, intraventricular, estereotáctica, intrahepática tal como a través de la vena porta, por inhalación y por vía intrapleurar. La administración intravenosa es el modo de administración preferido. Puede lograrse con la ayuda de una bomba de infusión.

La dosificación administrada varía dependiendo de factores tales como: la naturaleza del resto activo, la naturaleza de la composición conjugada, las características farmacodinámicas, su modo y vía de administración, la edad, salud y peso del receptor, la naturaleza y extensión de los síntomas, la clase de tratamiento simultáneo y la frecuencia de tratamiento.

Debido a que los compuestos conjugados se orientan específicamente a células con una o más moléculas de GCC, los compuestos conjugados que comprenden productos quimioterapéuticos o toxinas se administran en dosis menores que aquellos que se usan cuando los productos quimioterapéuticos o toxinas se administran como agentes activos o conjugados, preferiblemente en dosis que contienen hasta 100 veces menos agente activo. En algunas realizaciones, los compuestos conjugados que comprenden productos quimioterapéuticos o toxinas se administran en dosis que contienen 10-100 veces menos agente activo como resto activo que la dosificación de productos quimioterapéuticos o toxinas administrados como agentes activos no conjugados. Para determinar la dosis apropiada, se mide preferiblemente la cantidad de compuesto en moles en lugar de en peso. De este modo, el peso variable de los diferentes compuestos de la invención no afecta al cálculo. Suponiendo una relación de uno a uno de compuesto de la invención a resto activo en composiciones conjugadas de la invención, pueden administrarse menos moles de compuestos conjugados en comparación con los moles de compuestos no conjugados administrados, preferiblemente hasta 100 veces menos moles.

Típicamente, los conjugados quimioterapéuticos se administran por vía intravenosa en múltiples dosis divididas.

Se administran típicamente hasta 20 g IV/dosis de metotrexato en forma no conjugada. Cuando se administra metotrexato como resto activo en un compuesto conjugado de la invención, hay una reducción de dosis de 10 a 100 veces. Por tanto, suponiendo que cada compuesto conjugado incluye una molécula de metotrexato conjugada con un compuesto de la invención, está presente, y por lo tanto se administra, hasta aproximadamente 0,2-2,0 g de metotrexato de la cantidad total de compuesto conjugado. En algunas realizaciones, está presente, y por lo tanto se administra, hasta aproximadamente 200 mg/g de metotrexato de la cantidad total de compuesto conjugado.

En aquellas composiciones conjugadas que comprenden compuestos de la invención ligados con restos activos que son radioisótopos en composiciones farmacéuticas útiles como agentes de imagenología, se supone que cada compuesto de la invención está ligado con un resto activo radiactivo. La cantidad de radioisótopo para administrar depende del radioisótopo. Los especialistas en la materia pueden formular fácilmente la cantidad de compuesto conjugado para administrar basándose en la actividad específica y la energía de un radionucleido dado usado como resto activo. Típicamente, se administran 0,1-100 mCi por dosis de agente de imagenología, preferiblemente 1-10 mCi, lo más a menudo 2-5 mCi. Por tanto, las composiciones farmacéuticas según la presente invención útiles como agentes de imagenología que comprenden composiciones conjugadas que comprenden un compuesto de la invención y un resto radiactivo comprenden 0,1-100 mCi, en algunas realizaciones, preferiblemente 1-10 mCi, en algunas realizaciones preferiblemente 2-5 mCi, en algunas realizaciones más preferiblemente 1-5 mCi. Los ejemplos de dosificaciones incluyen: ^{131}I entre aproximadamente 0,1-100 mCi por dosis, en algunas realizaciones preferiblemente 1-10 mCi, en algunas realizaciones 2-5 mCi y en algunas realizaciones aproximadamente 4 mCi; ^{111}In entre aproximadamente 0,1-100 mCi por dosis, en algunas realizaciones preferiblemente 1-10 mCi, en algunas realizaciones 1-5 mCi y en algunas realizaciones aproximadamente 2 mCi; ^{99}Tc entre aproximadamente 0,1-100 mCi por dosis, en algunas realizaciones preferiblemente 5-75 mCi, en algunas realizaciones 10-50 mCi y en algunas realizaciones aproximadamente 27 mCi. Wessels B. W. y R. D. Rogus (1984) Med. Phys. 11: 638 y Kwok, C. S. et al. (1985) Med. Phys. 12:405, dan a conocer cálculos de dosis detallados para conjugados de diagnóstico y terapéuticos que pueden usarse en la preparación de composiciones farmacéuticas de la presente invención que incluyen compuestos conjugados radiactivos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de la invención para uso en un método de tratamiento de individuos sospechosos de padecer cáncer colorrectal metastásico y cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. Dichos individuos pueden tratarse mediante la administración al individuo de una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la invención y un resto activo, en el que el resto activo es un agente terapéutico radioestable. En algunas realizaciones de la presente invención, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la invención y un resto activo, en la que el resto activo es un agente terapéutico radioestable. En algunas realizaciones de la presente invención, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la invención y un resto

activo, en la que el resto activo es un agente activo radioestable seleccionado del grupo consistente en: metotrexato, doxorubicina, daunorubicina, arabinósido de citosina, etopósido, 5,4-fluorouracilo, melfalán, clorambucilo, cisplatino, vindesina, mitomicina, bleomicina, purotionina, macromomicina, derivados de 1,4-benzoquinona, trenimón, ricina, cadena A de ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de la difteria, fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*, ribonucleasa pancreática bovina, proteína antivírica de fitolaca, abrina, cadena A de abrina, factor de veneno de cobra, gelonina, saporina, modicina, viscumina, volkensina, fosfatasa alcalina, nitroimidazol, metronidazol y misonidazol. El individuo que se está tratando puede diagnosticarse que tiene cáncer colorrectal, de estómago o esofágico metastasizado o puede diagnosticarse que tiene cáncer colorrectal, de estómago o esofágico primario y puede experimentar tratamiento proactivamente en el caso de que hubiera cierta metástasis aún indetectada. La composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición conjugada. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que es eficaz para causar un efecto citotóxico o citostático sobre células cancerosas sin causar efectos secundarios letales en el individuo.

Un aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de la invención para uso en un método de tratamiento de individuos sospechosos de padecer cáncer colorrectal metastásico y cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. Dichos individuos pueden tratarse mediante la administración al individuo de una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la invención y un resto activo, en la que el resto activo es radiactivo. En algunas realizaciones de la presente invención, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la invención y un resto activo, en la que el resto activo es radiactivo y el compuesto de la invención es un anticuerpo. En algunas realizaciones de la presente invención, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la invención y un resto activo, en la que el resto activo es un agente radiactivo seleccionado del grupo consistente en: ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb y ^{212}Bi , ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}MPt , ^{197}Hg y todos los emisores beta negativos y/o de Auger. Algunos radionucleidos preferidos incluyen: ^{90}Y , ^{131}I , ^{211}At y $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$, todos los emisores beta negativos y/o de Auger. El individuo que se está tratando puede diagnosticarse que tiene cáncer metastasizado o puede diagnosticarse que tiene cáncer localizado, y puede experimentar el tratamiento proactivamente en el caso de que hubiera cierta metástasis aún indetectada. La composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición conjugada. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que es eficaz para causar un efecto citotóxico o citostático sobre células de cáncer colorrectal metastásico y células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico sin causar efectos secundarios letales en el individuo. La composición puede inyectarse por vía intratumoral en los tumores primarios.

Un aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de la invención para uso en un método de detección de células de cáncer colorrectal metastásico y cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico en un individuo sospechoso de padecer cáncer colorrectal, de estómago o esofágico primario o metastasizado mediante radioimagenología. Los individuos pueden ser sospechosos de tener tumores de estómago o esofágicos primarios cuyo diagnóstico puede confirmarse mediante la administración al individuo de un agente de imagenología que se une a GCC. Pueden formarse imágenes de los tumores detectando la localización en el estómago o esófago. Los individuos pueden diagnosticarse que tienen cáncer colorrectal, de estómago o esofágico metastasizado y las células de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico metastasizado pueden detectarse administrando al individuo, preferiblemente por administración intravenosa, una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la invención y un resto activo, en la que el resto activo es radiactivo, y detectando la presencia de una acumulación o agregación localizada de radiactividad que indica la presencia de células con GCC. En algunas realizaciones de la presente invención, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la invención y un resto activo, en la que el resto activo es radiactivo. En algunas realizaciones de la presente invención, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la invención y un resto activo, en la que el resto activo es un agente radiactivo seleccionado del grupo consistente en metales pesados radiactivos tales como quelatos de hierro, quelatos radiactivos de gadolinio o manganeso, emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio, ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{77}Br , $^{81}\text{Rb}/^{81}\text{MkR}$, ^{87}MSr , ^{99}MTc , ^{111}In , ^{113}Mn , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}I , ^{131}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi . El individuo que se está tratando puede diagnosticarse que tiene cáncer colorrectal, de estómago o esofágico metastasizado o puede diagnosticarse que tiene cáncer colorrectal, de estómago o esofágico localizado, y puede experimentar el tratamiento proactivamente en el caso de que hubiera cierta metástasis aún indetectada. La composición farmacéutica contiene una cantidad de la composición conjugada eficaz en el diagnóstico. Una cantidad eficaz en el diagnóstico es una cantidad que puede detectarse en un sitio del cuerpo donde las células con GCC están localizadas sin causar efectos secundarios letales en el individuo.

Imagenología fotodinámica y terapia

Según algunas realizaciones de la invención, los compuestos de la invención están conjugados con agentes de imagenología o terapéuticos fotoactivados. Maier A. et al. *Lasers in Surgery and Medicine* 26: 461-466 (2000) dan a

conocer un ejemplo de terapia fotodinámica. QLT, Inc (Vancouver, BC) distribuye comercialmente agentes activos fotosensibles que pueden ligarse con el compuesto de la invención. Dichos compuestos conjugados pueden usarse en protocolos terapéuticos e imagenológicos fotodinámicos para activar los agentes conjugados unidos a GCC que se orientan por tanto a células cancerosas. En algunas realizaciones, los compuestos conjugados se aplican como pulverizador intraoperatorio que se exponen posteriormente a la luz, para activar los compuestos unidos a células que expresan GCC.

En algunas realizaciones, el agente fotodinámico es un fluoróforo o porfirinas. Los ejemplos de porfirinas incluyen: derivado de hematoporfirina (HPD) y porfímero de sodio (Photofrin®). Es un fotosensibilizador de segunda generación BPD-verteporfina. En algunas realizaciones, el fluoróforo es tetrametilrotamina. Los láseres son generalmente la fuente primaria de luz usada para activar porfirinas. Pueden usarse también en algunas aplicaciones diodos emisores de luz (LED) y fuentes de luz fluorescente.

Además de en pulverizador intraoperatorio, los compuestos conjugados pueden suministrarse por vía intratecal, intraventricular, estereotáctica, intrahepática tal como a través de la vena porta, por inhalación y por vía intrapleural.

Suministro de fármaco orientado a células de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico generalmente

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones no conjugadas y conjugadas que comprenden un compuesto de la invención usado para suministrar agentes terapéuticos a células que comprenden GCC tales como células de cáncer colorrectal metastásico y de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático. En algunas realizaciones, el agente es un fármaco o toxina tal como: metotrexato, doxorubicina, daunorubicina, arabinósido de citosina, etopósido, 5,4-fluorouracilo, melfalán, clorambucilo, cisplatino, vindesina, mitomicina, bleomicina, purotionina, macromomicina, derivados de 1,4-benzoquinona, trenimón, ricina, cadena A de ricina, exotoxina de Pseudomonas, toxina de la difteria, fosfolipasa C de Clostridium perfringens, ribonucleasa pancreática bovina, proteína antivirica de fitolaca, abrina, cadena A de abrina, factor de veneno de cobra, gelonina, saporina, modicina, viscumina, volkenina, fosfatasa alcalina, nitroimidazol, metronidazol y misonidazol. Se suministra material genético a células cancerosas para producir un antígeno que pueda ser diana del sistema inmunitario o para producir una proteína que inactive la célula o inhiba su proliferación. En algunas realizaciones, se usa un compuesto de la invención para suministrar ácidos nucleicos que codifican moléculas de ácido nucleico que reemplazan a genes endógenos defectivos o que codifican proteínas terapéuticas. En algunas realizaciones, las composiciones se usan en protocolos de terapia génica para suministrar a individuos el material genético necesario y/o deseado para compensar una deficiencia genética.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se combina con o se incorpora a un vehículo de suministro, convirtiendo así el vehículo de suministro en un vehículo de suministro orientado específicamente. Por ejemplo, un compuesto de la invención puede integrarse en la porción externa de una partícula vírica, haciendo a dicho virus un virus específico de célula portadora de GCC. De forma similar, la proteína de cubierta de un virus puede genomanipularse de tal modo que se produzca en forma de una proteína de fusión que incluye un péptido compuesto activo de la invención que se expone o se hace accesible de otro modo al exterior de la partícula vírica, haciendo a dicho virus un virus específico de célula portadora de GCC. En algunas realizaciones, un compuesto de la invención puede integrarse o incorporarse de otro modo a liposomas en los que el compuesto de la invención se expone o hace accesible de otro modo al exterior del liposoma, haciendo a dichos liposomas específicamente orientados a células portadoras de GCC.

El agente activo en las composiciones conjugadas o no conjugadas según este aspecto de la invención es un fármaco, toxina o molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser ARN o preferiblemente ADN. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es una molécula anticodificante o codifica una secuencia anticodificante cuya presencia en la célula inhibe la producción de una proteína indeseable. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una ribozima cuya presencia en la célula inhibe la producción de una proteína indeseable. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína o péptido que se produce deseablemente en la célula. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una copia funcional de un gen que es defectivo en la célula diana. La molécula de ácido nucleico está preferiblemente ligada operativamente con los elementos reguladores necesarios para expresar la secuencia de codificación en la célula.

Los liposomas son vesículas pequeñas compuestas por lípidos. Se introducen en el centro de estas vesículas construcciones genéticas que codifican las proteínas que se desea expresar en células portadoras de GCC. La cubierta externa de estas vesículas comprende un compuesto de la invención. "Liposomes" volúmenes 1, 2 y 3 CRC Press Inc. Boca Raton Fla., dan a conocer la preparación de agentes activos encapsulados en liposomas que incluyen anticuerpos en la cubierta externa. En la presente invención, se asocia un compuesto de la invención con la cubierta externa. Composiciones no conjugadas que comprenden un compuesto de la invención en la matriz de un liposoma con un agente activo dentro.

En una realización, se logra el suministro de copias normales del gen supresor tumoral p53 a las células cancerosas usando un compuesto de la invención para orientar el producto de terapia génica. Las mutaciones del gen supresor tumoral p53 parecen desempeñar un papel relevante en el desarrollo de muchos cánceres. Es un enfoque para

combatir esta enfermedad el suministro de copias normales de este gen a las células cancerosas que expresan formas mutantes de este gen. Se incorporan construcciones genéticas que comprenden genes supresores tumorales p53 normales a liposomas que comprenden un compuesto de la invención. Se suministra la composición al tumor. Los compuestos de la invención se orientan específicamente y dirigen a los liposomas que contienen el gen normal para corregir la lesión creada por la mutación del gen supresor p53. La preparación de construcciones genéticas está dentro de las habilidades de los especialistas en la materia. La presente invención permite orientar dicha construcción específicamente usando los compuestos de la invención de la presente invención. Las composiciones de la invención incluyen un compuesto de la invención asociado a un vehículo de suministro y una construcción génica que comprende una secuencia de codificación de una proteína cuya producción se desea en las células del tracto intestinal, ligada a las secuencias reguladoras necesarias para la expresión en las células. Para la captación por células del tracto intestinal, las composiciones se administran por vía oral o por enema, con lo que entran en el tracto intestinal y se ponen en contacto con células que comprenden GCC. Los vehículos de suministro se asocian con GCC gracias al compuesto de la invención y el vehículo se internaliza en la célula o el agente activo/construcción genética se capta de otro modo por la célula. Una vez internalizada, la construcción puede proporcionar un efecto terapéutico al individuo.

Compuestos anticodificantes

La presente invención proporciona composiciones y kits que son útiles para prevenir y tratar células de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico proporcionando los medios para suministrar específicamente compuestos anticodificantes a células de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico y deteniendo así la expresión de genes en dichas células en que está teniendo lugar una expresión génica indeseable, sin afectar negativamente a células en que no aparece dicha expresión.

Las composiciones conjugadas de la presente invención son útiles para orientar a células que expresan GCC, incluyendo células de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico. Las composiciones conjugadas no se unirán a células derivadas no colorrectales. Las células no colorrectales, que carecen de GCC, no captan las composiciones conjugadas. Las células colorrectales normales tienen GCC y captarán las composiciones. La presente invención proporciona composiciones y métodos de suministro de composiciones anticodificantes a células colorrectales normales y cancerosas y a células de estómago o esofágicas cancerosas.

La presente invención proporciona un enfoque específico de célula en el que solo las células colorrectales normales y cancerosas y las células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico se exponen a la porción activa del compuesto, y solo esas células están afectadas por el compuesto conjugado. El compuesto de la invención se une a células colorrectales normales y cancerosas y a células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. Tras la unión a estas células, el compuesto conjugado se internaliza y se efectúa el suministro del compuesto conjugado incluyendo la porción anticodificante de la molécula. La presencia del compuesto conjugado en células colorrectales normales no tiene efecto sobre dichas células, porque el gen asociado al cáncer para el que es complementaria la molécula anticodificante que constituye el resto activo del compuesto conjugado no se está expresando. Sin embargo, en células de cáncer colorrectal, se está expresando el gen canceroso para el que es complementaria la molécula anticodificante que constituye el resto activo del compuesto conjugado. La presencia del compuesto conjugado en células de cáncer colorrectal sirve para inhibir o evitar la transcripción o traducción del gen canceroso y reducir o eliminar así el fenotipo transformado.

La invención puede usarse para combatir cáncer colorrectal, de estómago o esofágico primario y/o metastasizado, así como para evitar la aparición del fenotipo transformado en células de colon normales. Por tanto, la invención puede usarse terapéutica así como profilácticamente.

Un especialista en la materia puede identificar fácilmente a los individuos sospechosos de padecer cáncer de estómago o esofágico. En aquellos individuos diagnosticados con cáncer de estómago o esofágico, la terapia estándar es sospechar metástasis e intentar erradicar agresivamente las células metastasizadas. La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para orientar específicamente a y eliminar células de cáncer colorrectal metastasizado y células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden productos terapéuticos para eliminar específicamente células de cáncer colorrectal metastasizado y células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico.

La presente invención se basa en el uso del compuesto de la invención en una composición conjugada. El compuesto de la invención es esencialmente una porción de la composición conjugada que actúa como ligando de GCC, y por tanto se une específicamente a estos receptores. La composición conjugada incluye también un resto activo que está asociado al compuesto de la invención; siendo el resto activo una composición anticodificante útil para inhibir o evitar la transcripción o traducción de la expresión de genes cuya expresión está asociada al cáncer.

Según la presente invención, el resto activo es una composición anticodificante. En particular, la molécula anticodificante que constituye el resto activo de un compuesto conjugado hibrida con ADN o ARN en una célula de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico e inhibe y/o evita que tenga lugar la transcripción o traducción de ADN

o ARN. Las composiciones anticodificantes pueden ser una molécula de ácido nucleico, un derivado o un análogo del mismo. La naturaleza química de la composición anticodificante puede ser la de una molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico modificada o una molécula no de ácido nucleico que posee grupos funcionales que imitan una molécula de ADN o ARN, que es complementaria de la molécula de ADN o ARN cuya expresión ha de inhibirse o evitarse de otro modo. Las composiciones anticodificantes inhiben o evitan la transcripción o traducción de genes cuya expresión está ligada a cáncer colorrectal, de estómago o esofágico, concretamente genes asociados al cáncer.

Se han identificado en muchos tumores mutaciones puntuales por inserciones y deleciones en K-ras y H-ras. Características complejas de las alteraciones de los oncogenes HER-2/ERBB-2, HER-1/ERBB-1, HRAS-1, C-MYC y los antioncogenes p53, RB1.

La carcinogénesis química en un modelo de rata ha demostrado mutaciones puntuales en fos, un oncogén que media la regulación transcripcional y proliferación. Véase: Alexander, R J, et al. "Oncogene alterations in rat colon tumors induced by N-methyl-N-nitrosourea". American Journal of the Medical Sciences. 303(1): 16-24, enero de 1992.

La carcinogénesis química en un modelo de rata ha demostrado mutaciones puntuales en el oncogén abl. Véase: Alexander, R J, et al. "Oncogene alterations in rat colon tumors induced by N-methyl-N-nitrosourea". American Journal of the Medical Sciences. 303(1):16-24, enero de 1992.

MYC es un oncogén que desempeña un papel en la regulación de la transcripción y proliferación. Se incubó un oligonucleótido anticodificante de 15 bases de myc complementario de la región de inicio de la traducción del exón II con células de cáncer colorrectal. La molécula anticodificante inhibía la proliferación de células de cáncer colorrectal de forma dependiente de la dosis. De forma interesante, la captación de este oligonucleótido era baja (0,7 %). También la transferencia de un cromosoma normal 5 a células de cáncer colorrectal dio como resultado la regulación de la expresión de myc y la pérdida de proliferación. Estos datos sugieren que está contenido en este cromosoma un gen supresor tumoral importante en la regulación de myc.

Se ha identificado una proteína tirosina fosfatasa novedosa, G1. El examen del ARNm que codifica esta proteína en células de tumor colorrectal reveló que experimenta mutaciones puntuales y deleciones en estas células y puede desempeñar un papel en la proliferación característica de estas células. Takekawa, M. et al. "Chromosomal localization of the protein tyrosine phosphatase G1 gene and characterization of the aberrant transcripts in human colon cancer cells". FEBS Letters. 339(3): 222-8, 21 de febrero de 1994.

La gastrina regula el crecimiento de células de cáncer de colon mediante un mecanismo dependiente de AMP cíclico mediado por PKA. Los oligodesoxinucleótidos anticodificantes de la subunidad reguladora de una clase específica de PKA inhibían los efectos promotores del crecimiento de AMP cíclico en células de carcinoma de colon. Véase: Bold, R J, et al. "Experimental gene therapy of human colon cancer". Surgery. 116(2): 189-95; discusión 195-6, agosto de 1994 y Yokozaki, H., et al. "An antisense oligodeoxynucleotide that depletes RI alpha subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase induces growth inhibition in human cancer cells". Cancer Research. 53(4): 868-72, 15 de febrero de 1993.

CRIPTO es un gen relacionado con el factor de crecimiento epidérmico expresado en la mayoría de tumores de cáncer colorrectal. Los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato anticodificantes del extremo 5' de ARNm de CRIPTO reducían significativamente la expresión de CRIPTO e inhibían el crecimiento de células de tumor colorrectal in vitro e in vivo. Ciardiello, F. et al. "Inhibition of CRIPTO expression and tumorigenicity in human colon cancer cells by antisense RNA and oligodeoxynucleotides". Oncogene. 9(1): 291-8, enero de 1994.

Muchas células de carcinoma secretan factor de crecimiento transformante α . Un oligonucleótido anticodificante de 23 nucleótidos de ARNm de TGF α inhibía tanto la síntesis de ADN como la proliferación de células de cáncer colorrectal. Sizeland, A M, Burgess, A W. "Antisense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line". Molecular Biology of the Cell. 3(11): 1235-43, noviembre de 1992.

Se describen en general composiciones anticodificantes, incluyendo oligonucleótidos, derivados y análogos de los mismos, protocolos de conjugación y estrategias anticodificantes para la inhibición de la transcripción y traducción en: "Antisense Research and Applications", Crooke, S. y B. Lebleu, eds. CRC Press, Inc. Boca Raton Fla. 1993, "Nucleic Acids in Chemistry and Biology" Blackburn, G. y M. J. Gait, eds. IRL Press en Oxford University Press, Inc. Nueva York 1990; y "Oligonucleotides and Analogues : A Practical Approach" Eckstein, F. ed., IRL Press en Oxford University Press, Inc. Nueva York 1991.

Las moléculas anticodificantes de la presente invención comprenden una secuencia complementaria de un fragmento de un gen de cáncer colorrectal. Véase Ullrich et al., EMBO J., 1986, 5: 2503.

Las composiciones anticodificantes que pueden constituir un resto activo en compuestos conjugados de la invención incluyen oligonucleótidos formado por homopirimidinas que pueden reconocer tramos locales de homopurinas en la doble hélice de ADN y unirse a ellos en el surco mayor, formando una triple hélice. Véase: Helen, C y Toulme, J J. "Specific regulation of gene expression by antisense, sense, and antigene nucleic acids". *Biochem. Biophys Acta*, 1049: 99-125, 1990. La formación de la triple hélice interrumpiría la capacidad del gen específico de experimentar transcripción por ARN polimerasa. Se ha observado la formación de triple hélice usando oligonucleótidos específicos de myc. Véase: Cooney, M, et al. *Science* 241: 456-459.

Los oligonucleótidos anticodificantes de ADN o ARN complementarios de las secuencias en el límite entre intrones y exones pueden emplearse para evitar la maduración de transcritos de genes específicos de ARN nuclear recién generados hasta ARNm para transcripción. El ARN anticodificante complementario de genes específicos puede hibridar con el ARNm del gen *tat* y evitar su traducción. El ARN anticodificante puede proporcionarse a la célula como ARN "listo para usar" sintetizado *in vitro* o como gen anticodificante transfectado establemente en células que proporcionarán ARN anticodificante tras la transcripción. La hibridación con ARNm da como resultado la degradación de la molécula hibridada por ARNasa H y/o la inhibición de la formación de complejos de traducción. Ambas dan como resultado la incapacidad de producir el producto del gen original.

Las secuencias anticodificantes de ADN o ARN pueden suministrarse a células. Se han desarrollado varias modificaciones químicas para prolongar la estabilidad y mejorar la función de estas moléculas sin interferir en su capacidad de reconocimiento de secuencias específicas. Estas incluyen aumentar su resistencia a la degradación por ADNasas, incluyendo fosfotriésteres, fosfonatos de metilo, fosforotioatos, anómeros α , aumentar su afinidad por su diana mediante ligamiento covalente con diversos agentes intercalantes tales como psoralenos, y aumentar la captación por células mediante conjugación con diversos grupos, incluyendo polilisina. Estas moléculas reconocen secuencias específicas codificadas en ARNm y su hibridación evita la traducción y aumenta la degradación de estos mensajes.

Las composiciones conjugadas de la invención proporcionan un medio específico y eficaz para terminar la expresión de genes que causan transformaciones neoplásicas. La GCC experimenta endocitosis inducida por ligando y puede suministrar compuestos conjugados al citoplasma de células.

Los compuestos de la invención se conjugan directamente con composiciones anticodificantes tales como ácidos nucleicos que son activos en la inducción de una respuesta. Por ejemplo, los oligonucleótidos anticodificantes de MYC se conjugan directamente con un compuesto de la invención. Esto se ha efectuado empleando péptidos que se unen al receptor CD4. Véase: Cohen, J S, ed. "Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression. Topics in Molecular and Structural Biology". CRC Press, Inc., Boca Raton, 1989. El esqueleto preciso y su síntesis no se especifican, y pueden seleccionarse de técnicas bien establecidas. La síntesis implicaría conjugación química o síntesis directa de la molécula química mediante síntesis en fase sólida empleando la química de FMOC. Véase: Haralambidis, J, et al. (1987) *Tetrahedron Lett.* 28: 5199-5202. Como alternativa, el conjugado de péptido-ácido nucleico puede sintetizarse directamente mediante síntesis en fase sólida como quimera de péptido-ácido péptidonucleico mediante síntesis en fase sólida. Nielsen, P E, et al. (1994) "Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand". *Gene* 149:139-145.

En algunas realizaciones, la polilisina puede complejarse en composiciones conjugadas de la invención de forma no covalente con ácidos nucleicos y usarse para potenciar el suministro de estas moléculas al citoplasma de células. Además, los péptidos y proteínas pueden conjugarse con polilisina de forma covalente y complejarse este conjugado con ácidos nucleicos de forma no covalente, potenciando adicionalmente la especificidad y eficacia de captación de los ácidos nucleicos en células. Por tanto, el compuesto de la invención se conjuga químicamente con polilisina mediante técnicas establecidas. El compuesto conjugado de polilisina de la invención puede complejarse con ácidos nucleicos de elección. Por tanto, se emplearon conjugados de polilisina-orosomucoide para expresar específicamente plásmidos que contienen genes en células de hepatoma que expresan el receptor orosomucoide. Este enfoque puede usarse para suministrar genes enteros u oligonucleótidos. Por tanto, tiene el potencial de terminar la expresión de un gen indeseado (por ejemplo, MYC, *ras*) o reemplazar la función de un gen perdido o eliminado (por ejemplo, hMSH2, hMLH 1, hPMS1 y hPMS2).

Según una realización preferida, Myc sirve como gen cuya expresión se inhibe por una molécula anticodificante en una composición conjugada. Los compuestos de la invención se usan para suministrar un oligonucleótido anticodificante de 15 bases de myc complementario de la región de inicio de la traducción del exón II. El oligonucleótido anticodificante de 15 bases de MYC se sintetiza como se reseña en Collins, J F, Herman, P, Schuch, C, Bagby G C, Jr. *Journal of Clinical Investigation*. 89(5): 1523-7, mayo de 1992. En algunas realizaciones, la composición conjugada se conjuga con polilisina como se reseña anteriormente. Wu, G Y y Wu, C H. (1988) "Evidence for *ed* gene delivery to Hep G2 hepatoma cells *in vitro*". *Biochem.* 27: 887-892.

Las composiciones conjugadas pueden sintetizarse como una molécula química directamente por síntesis en fase sólida, a concentraciones picomolares a nanomolares, para que este conjugado suprima la síntesis de MYC en células de cáncer colorrectal *in vitro*.

Las moléculas anticodificantes preferiblemente hibridan con, concretamente son complementarias de, una secuencia nucleotídica que tiene 5-50 nucleótidos de longitud, más preferiblemente 5-25 nucleótidos y en algunas realizaciones 10-15 nucleótidos.

5 Además, los desapareamientos en las secuencias identificadas anteriormente que consiguen los métodos de la invención, de tal modo que las secuencias desapareadas sean sustancialmente complementarias de las secuencias de gen canceroso, se consideran también dentro del alcance de la divulgación. Los desapareamientos que permiten una complementariedad sustancial con las secuencias de gen canceroso serán conocidos por los especialistas en la materia una vez dotados de la presente divulgación. Los oligonucleótidos pueden estar también no modificados o

10 modificados.

Las composiciones y métodos terapéuticos pueden usarse para combatir cáncer colorrectal, de estómago o esofágico en casos en que el cáncer esté localizado y/o metastasizado. Se administra a los individuos una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto conjugado. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que es eficaz para causar un efecto citotóxico o citostático sobre células cancerosas sin causar efectos secundarios letales en el individuo. Un individuo al que se ha administrado una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición conjugada tiene una posibilidad aumentada de eliminar el cáncer colorrectal, de estómago o esofágico en comparación con el riesgo que tenía el individuo que no había recibido la cantidad terapéuticamente eficaz.

20 Para tratar cáncer colorrectal, de estómago o esofágico localizado, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto conjugado de tal modo que entre en contacto con el tumor localizado. Por tanto, el compuesto conjugado puede administrarse por vía oral o intratumoral. Se enseñan la formulación oral y rectal en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edición, 1990, Mack Publishing Co., Easton Pa.

25 Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden administrarse como una dosis única o en múltiples dosis. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse como agentes terapéuticos individuales o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los usos de la presente invención pueden combinarse con terapias convencionales, que pueden administrarse secuencial o simultáneamente.

30 La presente divulgación incluye un método de suministro de compuestos anticodificantes a células colorrectales normales y cancerosas y a células de cáncer de estómago o esofágico y la inhibición de la expresión de genes del cáncer en mamíferos. Los métodos comprenden la administración a un mamífero de una cantidad eficaz de una composición conjugada que comprende un compuesto de la invención conjugado con un oligonucleótido anticodificante que tiene una secuencia que es complementaria de una región de ADN o ARNm de un gen del

35 cáncer.

Los compuestos conjugados pueden administrarse a mamíferos en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, seleccionado con respecto a la vía de administración pretendida y a la práctica farmacéutica estándar. Las dosificaciones se fijarán con respecto al peso y condición clínica del paciente. Las composiciones conjugadas de la presente invención se administrarán durante un tiempo suficiente para que los mamíferos estén exentos de células indiferenciadas y/o células que tengan un fenotipo anormal. En usos terapéuticos, el tratamiento se prolonga durante el tiempo suficiente para inhibir la proliferación de células transformadas y las composiciones conjugadas pueden administrarse junto con otros agentes quimioterapéuticos para gestionar y combatir el cáncer del paciente.

45 Los compuestos conjugados de la invención pueden emplearse en el método de la invención individualmente o en combinación con otros compuestos. La cantidad para administrar dependerá también de factores tales como la edad, peso y condición clínica del paciente. Véase Gennaro, Alfonso, ed., "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edición, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

50 Métodos y composiciones para preparar y usar terapia génica orientada, composiciones anticodificantes y de fármacos

Los liposomas pueden prepararse mediante medios bien conocidos, en los que los compuestos de la invención pueden exponerse en el exterior de los liposomas. Dichos liposomas pueden contener cualquiera de los agentes activos descritos en la presente memoria en otras secciones de esta memoria descriptiva. Como alternativa, pueden proporcionarse construcciones genéticas a los liposomas para suministrar productos de terapia génica a células intestinales no malignas y malignas o a células extraintestinales tales como células de cáncer de estómago o esofágico, que expresan GCC. El suministro a células intestinales no malignas puede ser útil para proporcionar a dichas células genes funcionales para expresar proteínas para las que el individuo carece de un gen funcional, para

60 suplementar el gen del individuo o para proporcionar una proteína terapéutica. Por ejemplo, en pacientes que padecen fibrosis quística, la incorporación del gen de ADNasa a las células intestinales puede proporcionar un beneficio terapéutico al individuo. De forma similar, en pacientes con trastornos intestinales tales como enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad de Crohn, pueden ser útiles genes que puedan regular negativamente la respuesta inmunitaria o proteger a células ante la respuesta inmunitaria autodirigida.

65

Métodos de prevención y tratamiento de diarrea

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para regular negativamente la actividad enzimática guanilato ciclasa C (GCC) activando una ruta inhibidora. Según la presente invención, la actividad de la enzima GCC se inhibe al poner en contacto célula que tienen la enzima GCC activa con una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los compuestos de GCC de la invención son útiles para prevenir o tratar diarrea mediada por GCC. La presente invención se refiere a compuestos de la invención para uso en un método de prevención de que un individuo padezca diarrea mediada por GCC, tal como diarrea infecciosa, que comprende la etapa de administrar a dicho individuo una cantidad de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir la actividad de GCC. La presente invención se refiere a compuestos de la invención para uso en un método de tratamiento de un individuo que padece diarrea mediada por GCC, tal como diarrea infecciosa, que comprende la etapa de administrar a dicho individuo una cantidad de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para inhibir la actividad de GCC.

Según algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para prevenir la diarrea en seres humanos inducida por organismos productores de ST en países en desarrollo; para prevenir el retraso de crecimiento en niños en países en desarrollo en que los organismos productores de ST son endémicos; para prevenir la diarrea del viajero y para prevenir la diarrea del ganado y otras enfermedades diarreicas en animales; así como para tratar diarrea secretora de etiología desconocida y para tratar síndrome del intestino irritable y otras formas de diarrea incluyendo, pero sin limitación, diarrea asociada a enfermedad inflamatoria intestinal, esprúe, etc.

El método de la presente invención comprende inhibir la actividad de GCC poniendo en contacto células que tienen GCC activa con una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se han descubierto compuestos antagonistas según la invención que regulan negativamente la actividad de GCC. La exposición de células in vitro a un compuesto de la invención ha dado como resultado la inhibición de la actividad de GCC. La inhibición de la actividad de GCC bloquea la ruta asociada a la diarrea mediada por GCC.

El método que es la presente invención es útil en la prevención y el tratamiento de afecciones asociadas a GCC activa, específicamente diarrea mediada por GCC tal como diarrea infecciosa. En consecuencia, la presente invención se refiere a compuestos de la invención para uso en un método de prevención de diarrea mediada por GCC o a compuestos de la invención para uso en un método de tratamiento de un individuo que padece diarrea mediada por GCC. La presente invención se refiere a compuestos de la invención para uso en un método de prevención de diarrea infecciosa en un individuo propenso a diarrea infecciosa. La presente invención se refiere a compuestos de la invención para uso en un método de tratamiento de un individuo que padece diarrea infecciosa. El individuo es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. En algunas realizaciones, el individuo puede ser de especie canina, felina, bovina, ovina o equina.

La identificación de un individuo sospechoso de padecer diarrea mediada por GCC tal como diarrea infecciosa es rutinaria y puede efectuarse por los especialistas en la materia. La diarrea infecciosa, a la que se hace referencia también como diarrea del viajero, puede identificarse rutinariamente. Además de ser útil para tratar individuos sospechosos de padecer diarrea mediada por GCC, la presente invención es útil profilácticamente para prevenir la incidencia de diarrea mediada por GCC en individuos con riesgo de contraer la afección. Por ejemplo, viajeros y aquellos que viven en situaciones para las que no están acostumbrados pueden estar en riesgo. Los especialistas en la materia pueden identificar fácilmente las afecciones que plantean al individuo un riesgo de contraer diarrea infecciosa mediada por GCC.

En algunas realizaciones preferidas, los compuestos de la invención son para uso en un método de tratamiento de un individuo sospechoso de padecer diarrea mediada por GCC que comprende la etapa de administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. Además, pueden usarse en la presente invención sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

Pueden usarse en la presente invención sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos. Pueden usarse también en la presente invención composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables útiles en la invención incluyen sodio, potasio, calcio, cinc, licio, magnesio, aluminio, dietanolamina, trometamina, etilendiamina, meglumina, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico o ácido acético.

La presente invención se refiere a un método de uso de compuestos antagonistas de la invención para inhibir la actividad de GCC en células. El intervalo de cantidades de compuesto de la invención a las que puede exponerse una célula que sean eficaces para inhibir la actividad de GCC puede determinarse por un especialista en la materia.

Al inhibir la actividad de GCC, la presente invención es útil en el tratamiento de diarrea mediada por GCC. Las cantidades eficaces de compuestos de la invención usados en la presente invención pueden formularse como preparaciones farmacéuticas y administrarse a individuos que se sospecha que padecen, o tienen tendencia a diarrea mediada por GCC, para contrarrestar la ruta bioquímica que conduce a la afección a nivel celular.

El tratamiento de diarrea mediada por GCC puede efectuarse mediante la administración de cantidades eficaces de una preparación farmacéutica del compuesto de la invención para inhibir GCC. Los compuestos pueden formularse

para aplicaciones profilácticas y terapéuticas humanas y animales por los especialistas en la materia. Puede determinarse por los especialistas en la materia un intervalo de dosificación de un compuesto para administrar a mamíferos, particularmente seres humanos, que sea eficaz en el tratamiento o la prevención de diarrea mediada por GCC.

5 Las composiciones farmacéuticas que incorporan compuestos usados en la invención pueden usarse para bloquear la actividad de GCC relacionada con la ruta bioquímica que da como resultado diarrea mediante la administración de cantidades eficaces de la preparación farmacéutica que comprende los compuestos dados a conocer en la presente memoria. Los compuestos usados en la invención pueden formularse para aplicaciones profilácticas y terapéuticas humanas y animales por los especialistas en la materia. Puede determinarse por los especialistas en la materia el intervalo de cantidades de compuesto para administrar a mamíferos, particularmente seres humanos, que sean eficaces para tratar o prevenir diarrea mediada por GCC.

15 El modo de administración de los compuestos y composiciones farmacéuticas según los usos de la invención incluye cualquier medio que produzca el contacto del ingrediente activo con el sitio de acción del agente en el cuerpo de un mamífero, es decir en las células del colon. Estos modos de administración incluyen, pero sin limitación, los métodos de administración oral, tópica, hipodérmica, intravenosa, intraanal, intramuscular e intraperitoneal. La vía de administración preferida es la oral.

20 En la práctica de los usos de la invención, los compuestos pueden administrarse individualmente o en combinación con otros compuestos útiles para tratar o prevenir diarrea. En los usos de la invención, los compuestos se administran preferiblemente con un portador farmacéuticamente aceptable seleccionado basándose en la vía de administración seleccionada y la práctica farmacéutica estándar.

25 El uso puede incluir la administración de compuestos a mamíferos, preferiblemente seres humanos, en cantidades terapéuticamente eficaces que sean eficaces para inhibir la GCC. La dosificación administrada en cualquier caso particular dependerá de factores tales como las características farmacodinámicas del compuesto de la invención, su modo y ruta de administración, la edad, salud y peso del receptor, la naturaleza y extensión de los síntomas, la clase de tratamiento simultáneo, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

30 Se contempla que la dosificación diaria de compuesto usado en el método que es la invención estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 g al día. En algunas realizaciones preferidas, la dosificación diaria de compuesto estará en el intervalo de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g al día. En algunas realizaciones preferidas, la dosificación diaria de compuesto estará en el intervalo de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg al día. Se contempla que la dosificación diaria de compuesto usado en el método que es la invención estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, en algunas realizaciones, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 40 mg por kg de peso corporal, en algunas realizaciones de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal y en algunas realizaciones de 1 µg a aproximadamente 1 mg por kg.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una dosificación única, dosificaciones divididas o como liberación prolongada. En algunas realizaciones preferidas, el compuesto se administrará en múltiples dosis al día. En algunas realizaciones preferidas, el compuesto se administrará en 3-4 dosis al día.

45 La administración de compuestos incluye la administración como composición farmacéutica por vía oral en formas de dosificación sólidas tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas de dosificación líquidas tales como elixires, jarabes y suspensiones. Los compuestos pueden administrarse también por vía parenteral en formas de dosificación líquidas estériles o por vía tópica en un portador. Los compuestos pueden formularse en formas de dosificación según prácticas estándares en el campo de las preparaciones farmacéuticas. Véase "Remington's Pharmaceutical Sciences", A. Osol, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

50 Los compuestos pueden mezclarse con portadores en polvo tales como lactosa, sacarosa, manitol, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio y ácido esteárico para inserción en cápsulas de gelatina o para conformación en comprimidos. Tanto comprimidos como cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación prolongada para la liberación continua de medicación durante un periodo de horas. Los comprimidos por compresión pueden recubrirse con azúcar o película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger al comprimido de la atmósfera o recubrirse entéricamente para disgregación selectiva en el tracto gastrointestinal. En algunas realizaciones preferidas, los compuestos se suministran por vía oral y se recubren con un recubrimiento entérico que pone a disposición a los compuestos para pasar a través del estómago y entrar en el tracto intestinal, preferiblemente tras entrar en el intestino grueso. La patente de EE.UU. nº 4.079.125 enseña un recubrimiento entérico que puede usarse para preparar un compuesto con recubrimiento entérico de la invención útil en los métodos de la invención.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden contener colorantes y aromatizantes para aumentar el cumplimiento del paciente, además de un diluyente farmacéuticamente aceptable tal como agua, tampón o solución salina.

Para administración parenteral, puede mezclarse un compuesto con un portador o diluyente adecuado tal como agua, un aceite, solución salina, dextrosa acuosa (glucosa) y soluciones de azúcar relacionadas, y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles. Las soluciones para administración parenteral contienen preferiblemente una sal hidrosoluble del compuesto. Pueden añadirse también agentes estabilizantes, agentes antioxidantes y conservantes. Los agentes antioxidantes adecuados incluyen bisulfito de sodio, sulfito de sodio y ácido ascórbico, ácido cítrico y sus sales y EDTA de sodio. Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, metil- o propilparabeno y clorobutanol.

Según algunos aspectos de la invención, la prevención de la diarrea y la deshidratación que la acompaña en niños previene el retraso de crecimiento, un problema significativo entre los niños de países en desarrollo en que los organismos productores de ST son endémicos. Los viajeros pueden evitar la diarrea del viajero mediante la administración profiláctica de los compuestos de la invención antes y durante el viaje a localizaciones donde los organismos productores de ST son endémicos. La administración de los compuestos de la invención puede usarse para prevenir la diarrea del ganado y otras enfermedades diarreicas en animales identificados por tener tendencia a las mismas. Los individuos que padecen diarrea secretora de etiología desconocida pueden tratarse mediante la administración de los compuestos de la invención. Aspectos de la presente invención incluyen compuestos de la invención para uso en el tratamiento de individuos identificados por tener síndrome del intestino irritable u otras formas de diarrea.

Aspectos de la presente invención incluyen métodos de imagenología de túbulos renales proximales y de tratamiento de enfermedades y trastornos renales que implican los mismos, tales como algunos cánceres renales, métodos de imagenología de células del conducto exocrino del páncreas y tratamiento de enfermedades y trastornos pancreáticos que implican el mismo, tales como algunos cánceres pancreáticos, métodos de imagenología de glándulas submandibulares y tratamiento de enfermedades y trastornos que implican las mismas, y métodos de imagenología de conducto biliar y tratamiento de enfermedades y trastornos que implican el mismo, tales como algunos cánceres de vesícula biliar. En cada caso, las enseñanzas anteriores pueden aplicarse en general y adaptarse de las discutidas anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se han diseñado compuestos de GCC de la invención que se unen al receptor con alta afinidad pero no inducen la producción de GMP cíclico. Los péptidos bloquean la posibilidad de unión a GCC de ST, el agonista más potente de GCC conocido, e inducen la acumulación de GMP cíclico. Por tanto, los péptidos satisfacen los criterios de un compuesto de GCC de la invención. La estructura de estos compuestos de la invención identifica un péptido nuclear que media la unión a GCC y el cambio a agonista que induce la producción de GMP cíclico.

Las moléculas derivaban de ST. La comparación de la estructura del compuesto de la invención con los agonistas conocidos revela los determinantes nucleares requeridos para la ocupación del receptor y activación del agonista. Todos los agonistas de GCC biológicamente activos conocidos poseen puentes disulfuro intracatenarios entre las cisteínas en posiciones 6 y 14 y las posiciones 9 y 17. Además, algunos agonistas tales como las ST tienen un enlace disulfuro intracatenario entre las cisteínas en posiciones 5 y 10. El compuesto de la invención, que se une a GCC pero no activa la producción de GMP cíclico, retiene los enlaces disulfuro intracatenarios en posiciones 5 y 10 y en posiciones 6 y 14, pero no el enlace disulfuro en posiciones 9 y 17. Estos datos demuestran que las estructuras nucleares consistentes en los residuos 5-17 y que poseen enlaces disulfuro en las posiciones 5 y 10 y las posiciones 6 y 14 abarcan los determinantes para unión a GCC, pero la estructura formada y abarcada por los enlaces disulfuro intracatenarios en posiciones 9 y 17 contiene el cambio a agonista que activa GCC para producir GMP cíclico.

La identificación de esta estructura proporciona una plataforma para desarrollar agonistas y compuestos de GCC de la invención que exhiben una mayor potencia, eficacia y especificidad que los ligandos existentes. Además, esta estructura proporciona una plataforma para desarrollar agonistas no peptídicos y compuestos de la invención que confiere una mayor estabilidad para facilitar el suministro oral, intravenoso, subcutáneo u otro en ausencia de degradación por proteasas.

Las estructuras de los compuestos de la invención se exponen en la Tabla 2 junto con la estructura de la enterotoxina termoestable de E. coli STa. Las posiciones numéricas hacen referencia a la de la toxina STa.

Posición	5	6	9	10	14	17
<i>E. coli</i> STa	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>
ST(4-14)						
Ala9,17	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>
ST(4-14)						
NMeLeu9	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>L</u> *	<u>C</u>	<u>C</u>	
ST(4-14)						
NMeAla9	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>*C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>
ST(4-14)						
Phe9						
Cys(Mob)						
5,10						
Mono	<u>C†</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>C†</u>	<u>C</u>	<u>A</u>
ST(4-14)	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	
Phe9						
ST(4-14)						
NMeVal9	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>V</u> *	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>
ST(5-14)						
Ala9Tyr15	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>Y</u>
ST(4-14)						
Thr9Tyr15	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>Y</u>
ST(4-14)						
Thr9	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>α</u>	<u>C</u>
Aib13e						
ST(4-14)						
Thr9Aib12	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>α</u>	<u>A</u>
ST(4-14)						
Leu9Tyr15	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>Y</u>
ST(4-14)						
Ala9			<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>E</u>
NMeAla13						
ST(5-14)			<u>C</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>C</u>
Ala9						
ST(6-14)						
Mpr5						
Ala9			<u>γδ</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>
Carba5,10					<u>A</u>	<u>δ</u>

* indica que el aminoácido está N-metilado
† indica que el aminoácido está bloqueado con Mob
α indica Aib
γ indica Mpr
δ indica ligamento Carba

Ejemplo 2

- 5 Se cultivaron células de adenocarcinoma colorrectal humano T84 hasta confluencia y se recogieron usando una solución de tripsina/EDTA. Se diluyeron estas células 10 veces (v/v) con medio esencial mínimo de Dulbecco/F12 más suero fetal bovino al 10 % (DMEM/F12/FBS) y se sembraron a una densidad de 20.000 células/pocillo en una placa Falcon de 96 pocillos. Se cultivaron las células en esta placa de 96 pocillos hasta casi confluencia en DMEM/F12/FBS, se lavaron entonces una vez secuencialmente con 200 µl cada uno de solución tamponada con fosfato de Dulbecco (sin Ca o Mg) y medio exento de suero Opti-mem. Se retiró el medio Opti-mem y se reemplazó por 90 µl de medio Opti-mem que contiene IBMX (iso) 1,1 mM. Se incubó esta solución con las células durante 15 minutos a 37 °C y se añadieron entonces 10 µl de análogo de ST (10x concentración final deseada). Se mezcló esta solución y se incubó a 37 °C durante 15 minutos antes de aspirar el medio y reemplazar por 200 µl de reactivo de
- 10

lisis 1 (bromuro de dodeciltrimetilamonio al 0,5 % acuoso) de Amersham Biosciences cGMP Enzyme Immunoassay Biotrak System y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Se cuantificaron los niveles de GMPc frente a una curva patrón de GMPc usando el sistema Amersham Biosciences cGMP competitive Enzyme Immunoassay Biotrak System. Este sistema detecta el GMPc de la siguiente manera: se adhiere una IgG de burro anticonejo a la placa de inmunoensayo y se incuba con anticuerpo de conejo anti-GMPc. Se coincuban entonces los pocillos con lisado de cultivo celular y una cantidad estándar de conjugado de GMPc-peroxidasa de rábano picante durante 2 horas a 4 °C y se lava antes de la adición del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno, que genera un color azul. La adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 M (ac) estabiliza el color y se lee entonces a 450 nm. Los datos se muestran en la figura 5.

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula (III):

5 (III) R301 - R302 - R303 - R304 - R305 - R306 - R307- R308 - R309

en la que:

10 R301 está ausente o se selecciona del grupo consistente en: 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos y combinaciones de los mismos;

15 R302 es C entrecruzada con C de R306;

R303 es C entrecruzada con C de R308;

R304 es E-L; en el que R304 forma un grupo de giro de hélice 3_{10} que liga R303 con R305;

20 R305 se selecciona del grupo consistente en: L, T, F, V, I, Y, N-metil-Leu, N-metil-Ala o N-metil-Val, en el que

R305 no se entrecruza con R309;

25 R306 es C entrecruzada con C de R302;

R307 es N-P-A, en el que R307 forma un grupo de giro beta que liga R306 con R308;

R308 es C entrecruzada con C de R303; y

30 R309 está ausente o se selecciona del grupo consistente en: 1-50 aminoácidos naturales, 1-50 aminoácidos bloqueados, 1-50 aminoácidos sintéticos, 1-50 aminoácidos derivatizados, 1-50 miméticos de aminoácidos, 1-50 alquilos, uno o más de 1-50 alquilos sustituidos, uno o más de 1-50 arilos, uno o más de 1-50 arilos sustituidos, uno o más de 1-50 alquilarilos, uno o más de 1-50 alquilarilos sustituidos y combinaciones de los mismos;

35 en la que R309 no se entrecruza con R305.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es un compuesto conjugado que tiene un compuesto de fórmula (III) conjugado con un resto activo seleccionado del grupo consistente en: un radionucleido, una enzima, un marcaje fluorescente, un grupo quelante metálico, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente, un producto quimioterapéutico, una toxina, un profármaco inactivo, un agente radiosensibilizador, un agente fotodinámico, una molécula de ácido nucleico o combinaciones de los mismos.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es un compuesto conjugado que tiene un compuesto de fórmula (III) conjugado con un resto activo seleccionado del grupo consistente en: ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , ^{81}Mg , ^{87}Sr , ^{99}Mn , ^{111}In , ^{113}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}I , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb y ^{212}Bi , ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}Mn , ^{197}Hg ; un emisor beta negativo, un emisor de Auger; malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, α -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa; isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina; metales emisores de fluorescencia; ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); luminol, isoluminol, éster de acridinio aromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato; luciferina, luciferasa y aequorina; metotrexato (ametofterina), doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, arabinósido de citosina, etopósido, 5,4-fluorouracilo, melfalán, clorambucilo, cisplatino, vindesina, mitomicina, bleomicina, purotionina, macromomicina, derivados de 1,4-benzoquinona, trenimón; ricina, cadena A de ricina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE), toxina de la difteria (DT), fosfolipasa C de *Clostridium perfringens* (PLC), ribonucleasa pancreática bovina (BPR), proteína antivirica de fitolaca (PAP), abrina, cadena A de abrina (toxina de abrina), factor de veneno de cobra (CVF), gelonina (GEL), saporina (SAP), modicina, viscumina y volkensina; fosfato de etopósido, nitroimidazoles, metronidazol y misonidazol; fluoróforo derivado de hematoporfirina (HPD), porfímero de sodio (PhotofrinTM), BPD-verteporfina y tetrametilrotamina.

4. Un compuesto conjugado que comprende un resto de fórmula (III) que está conjugado con un resto activo que puede ser un radionucleido, una enzima, un marcaje fluorescente, un grupo quelante metálico, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente, un producto quimioterapéutico, una toxina, un profármaco

inactivo, un agente radiosensibilizador, un agente fotodinámico, una molécula de ácido nucleico o combinaciones de los mismos.

- 5 5. Una composición que comprende liposomas que comprenden un compuesto de la reivindicación 1 en combinación con un agente activo seleccionado del grupo consistente en un radionucleido, una enzima, un marcaje fluorescente, un grupo quelante metálico, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente, un producto quimioterapéutico, una toxina, un profármaco inactivo, un agente radiosensibilizador, un agente fotodinámico, una molécula de ácido nucleico o combinaciones de los mismos.
- 10 6. Una combinación que comprende un compuesto de la invención 1 en combinación con un agente quimioterapéutico, una toxina o combinaciones de los mismos.
- 15 7. Un método de diagnóstico de cáncer caracterizado por la expresión de GCC en un individuo, que comprende la etapa de detectar GCC en una muestra extraintestinal de un individuo mediante la puesta en contacto de la muestra o porciones de la misma con el compuesto de la reivindicación 1, y detectar la presencia del compuesto unido a la muestra.
- 20 8. Un método de imagenología de cáncer caracterizado por la expresión de GCC en un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo un compuesto conjugado que comprende un compuesto de la reivindicación 4 en el que el resto activo del compuesto conjugado es un marcador detectable, en el que se detecta la acumulación del compuesto conjugado en un sitio del cuerpo del individuo.
- 25 9. Un compuesto de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de cáncer caracterizado por la expresión de GCC en un individuo que inactiva o inhibe la replicación de las células a las que se une.
- 30 10. Un compuesto de la reivindicación 1 para uso en el diagnóstico de cáncer caracterizado por la expresión de GCC en un individuo.
- 35 11. Un método de la reivindicación 7 u 8 o un compuesto para uso de las reivindicaciones 9 o 10, en el que el cáncer caracterizado por la expresión de GCC es cáncer colorrectal metastásico, cáncer esofágico primario, cáncer esofágico metastásico, cáncer de estómago primario o cáncer de estómago metastásico.
- 40 12. Un compuesto con una estructura según la fórmula (III) para uso en el tratamiento de un individuo que tiene diarrea mediada por enterotoxina o que tiene riesgo de contraer diarrea mediada por enterotoxina en condiciones tales que la C terminal no sea degradable, de tal modo que el compuesto se convierta en un agonista.
13. Un compuesto con una estructura según la reivindicación (III) para uso en el tratamiento de un individuo que tiene cáncer o que tiene riesgo de desarrollar cáncer en condiciones tales que la C terminal sea degradable, de tal modo que el compuesto se convierta en un agonista.
14. El compuesto para uso de la reivindicación 13, en el que el compuesto se administra en combinación con un agente quimioterapéutico o una toxina.

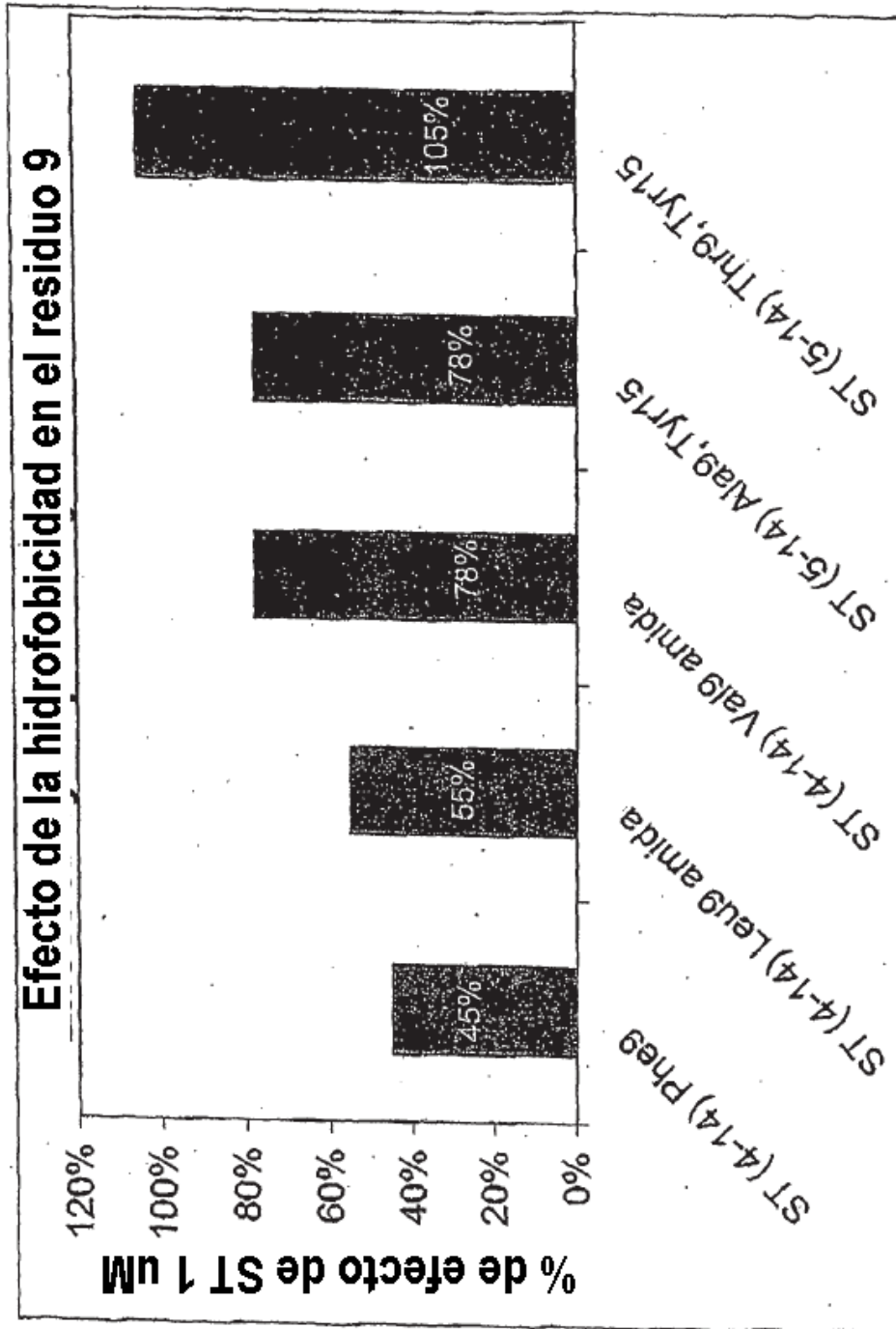


FIGURA 1

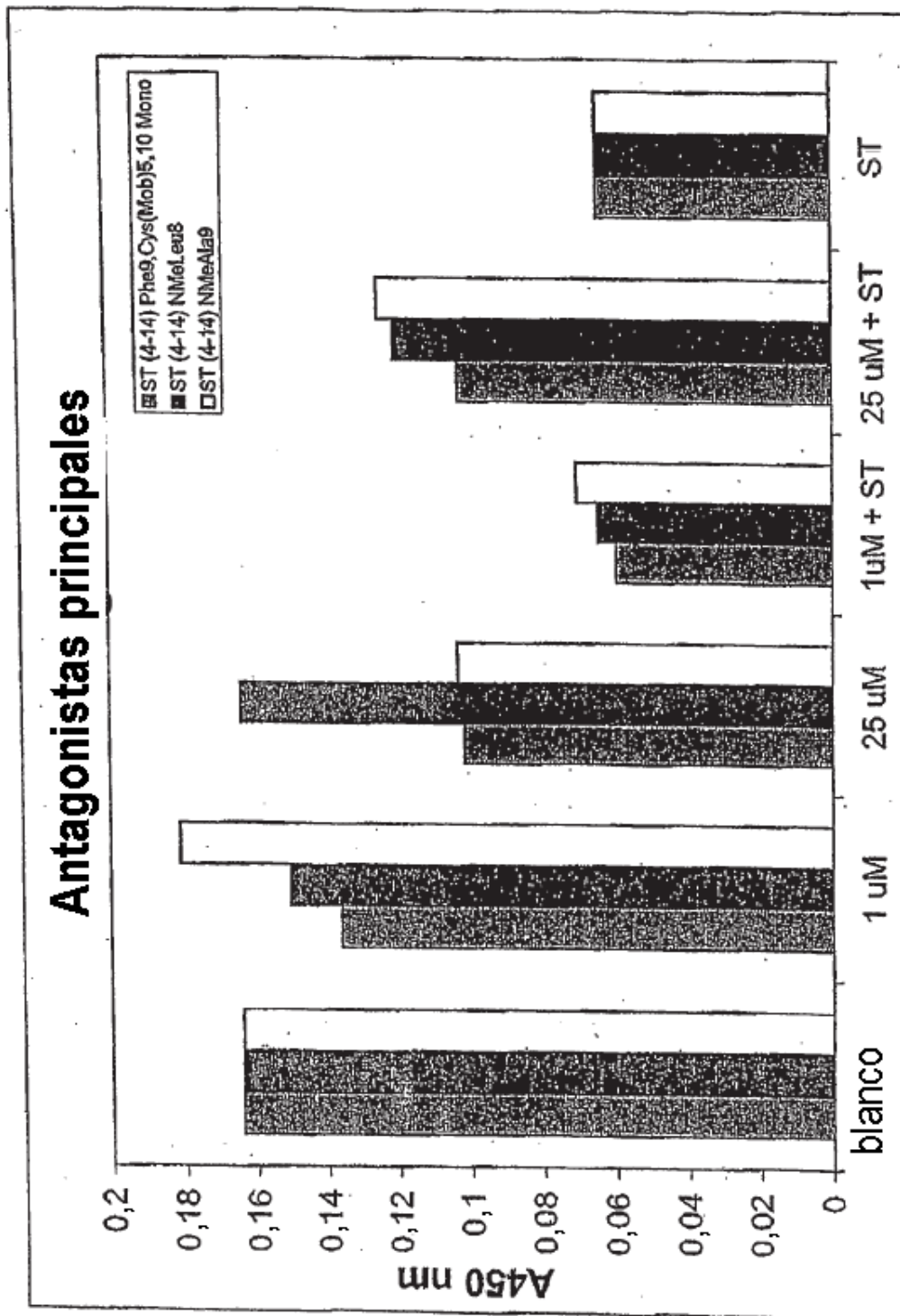


FIGURA 2

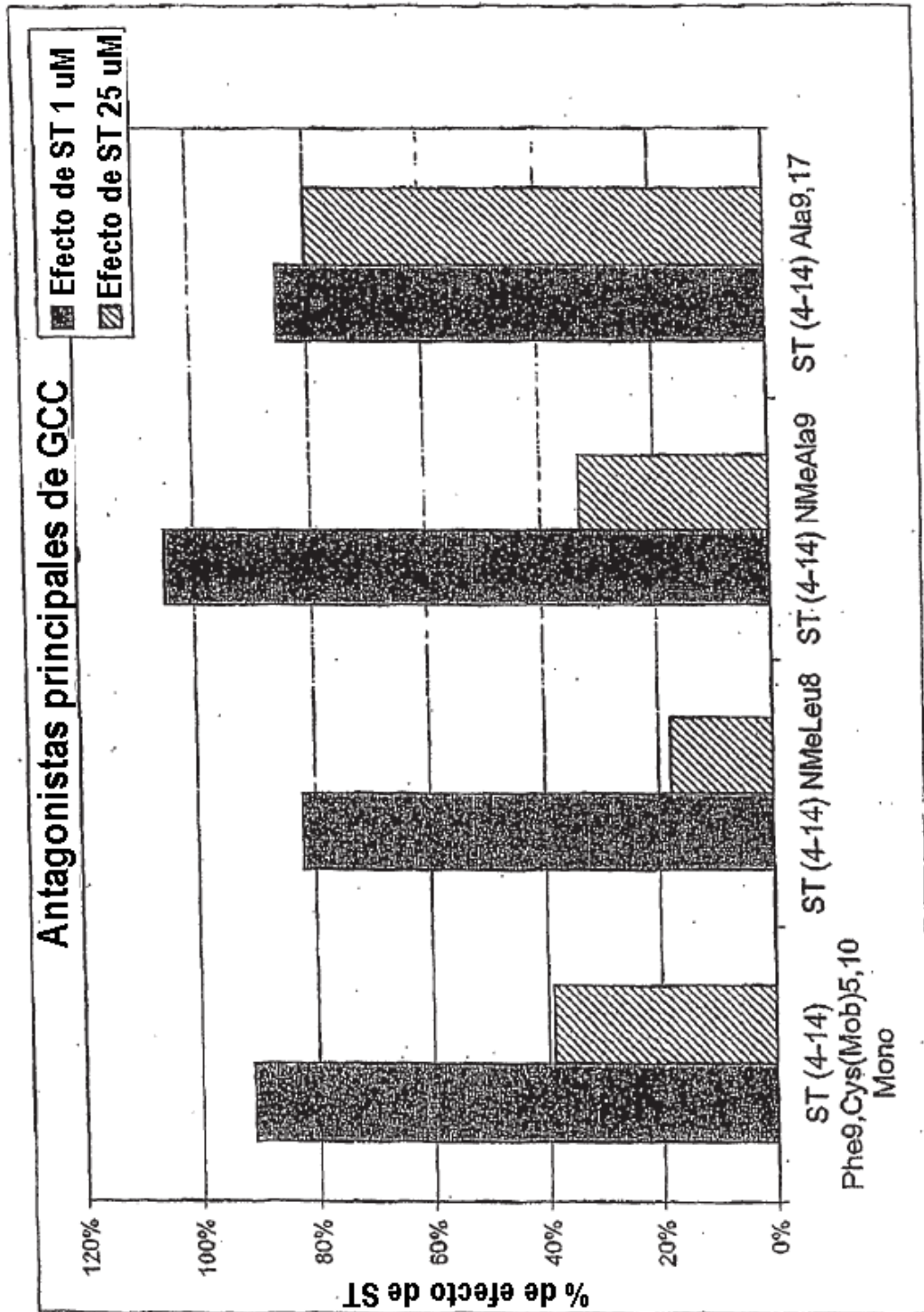
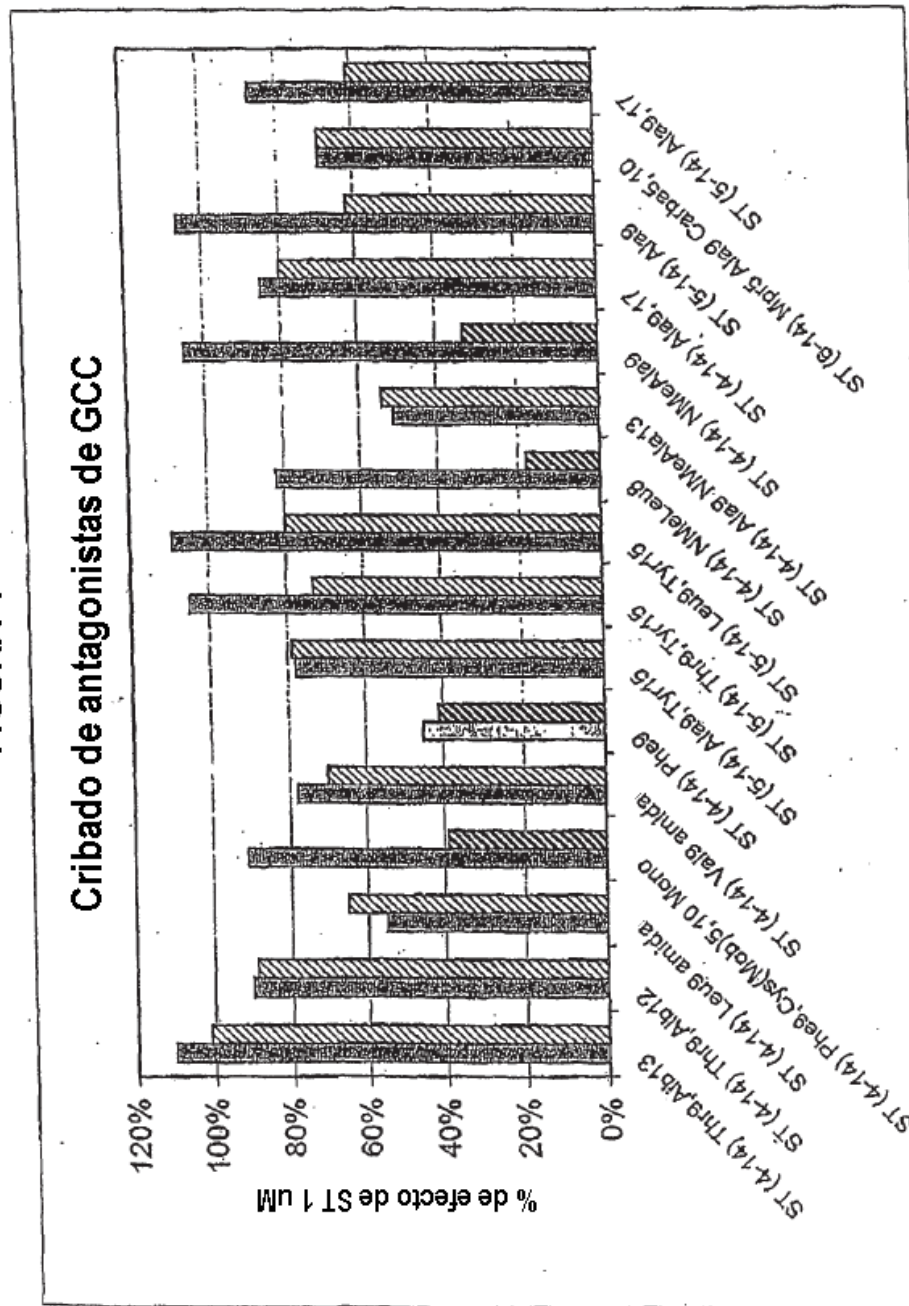


FIGURA 3

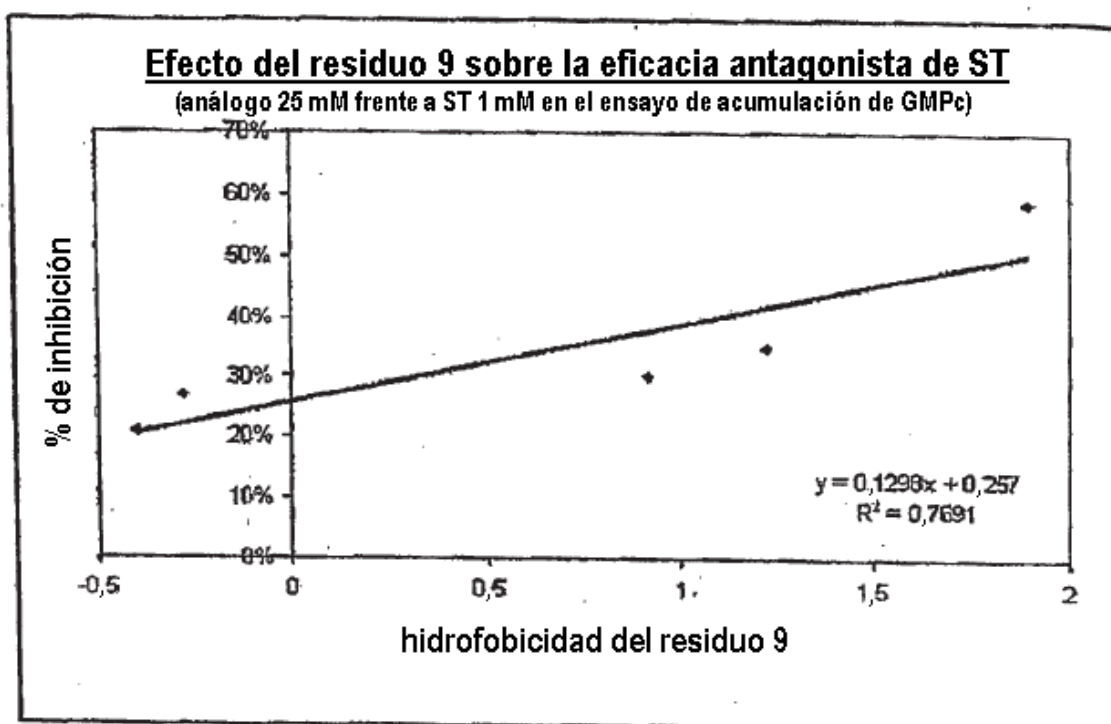
FIGURA 4



Células T84 confluentes en una placa de 96 pocillos. Todas las células tratadas con ST 1 μ M (5-18)
El % de efecto de ST cae en la producción de GMPc por incubación con análogo 1 μ M o bien 25 μ M (5-18)

Compuesto	Efecto de ST 1 μ M	Efecto de ST 25 μ M
ST(4-14) Thr ¹ Ala ²	110%	101%
ST(4-14) Thr ¹ Ala ²	90%	89%
ST(4-14) Leu ¹ amida	65%	65%
ST(4-14) Phe ¹ Cys(Mob) ^{2,10} Mono	91%	39%
ST(4-14) Val ¹ amida	78%	70%
ST(4-14) Phe ¹	45%	41%
ST(5-14) Ala ¹ Tyr ¹⁰	78%	79%
ST(5-14) Thr ¹ Tyr ¹⁰	105%	73%
ST(5-14) Leu ¹ Tyr ¹⁰	109%	80%
ST(4-14) N ¹⁰ Leu ⁸	82%	18%
ST(4-14) Ala ¹ N ¹⁰ Ala ⁹	51%	54%
ST(4-14) N ¹⁰ Ala ⁹	105%	33%
ST(4-14) Ala ¹	85%	80%
ST(5-14) Ala ¹	108%	62%
ST(6-14) Mpr ¹ Ala ² Carba ^{3,10}	69%	68%
ST(5-14) Ala ¹	87%	61%

FIGURA 5

**FIGURA 6**