

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 050**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/48** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2009 PCT/US2009/066600**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10065751**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2009 E 09771626 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2373296**

54 Título: **Formulaciones de agonistas de guanilato ciclasa C y métodos de uso**

30 Prioridad:

**03.12.2008 US 119521 P**

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

**05.04.2017**

73 Titular/es:

**SYNERGY PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)  
420 Lexington Avenue, Suite 2012  
New York, NY 10170, US**

72 Inventor/es:

**SHAILUBHAI, KUNWAR y  
COMISKEY, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

ES 2 608 050 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

Formulaciones de agonistas de guanilato ciclasa C y métodos de uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a formulaciones novedosas de agonistas de guanilato ciclasa C que están optimizados para su administración a regiones específicas del tracto gastrointestinal y son útiles para el tratamiento y la prevención de enfermedades y trastornos gastrointestinales.

10

**Antecedentes de la invención**

La guanilato ciclasa C es una forma transmembrana de guanilato ciclasa que se expresa en diversas células, incluyendo células epiteliales gastrointestinales (revisado en Vaandrager 2002 Mol. Cell. Biochem. 230:73-83). Se descubrió originalmente como receptor intestinal para los péptidos de toxina estables térmicamente (ST) secretados por bacterias entéricas y que provocan diarrea. Los péptidos ST comparten una estructura de aminoácidos primaria similar con dos péptidos aislados de mucosa intestinal y orina, guanilina y uroguanilina (Currie, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:947-951 (1992); Hamra, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:10464-10468 (1993); Forte, L., Reg. Pept. 81:25-39 (1999); Schulz, *et al.*, Cell 63:941-948 (1990); Guba, *et al.*, Gastroenterology 111:1558-1568 (1996); Joo, *et al.*, Am. J. Physiol. 274:G633-G644 (1998)).

En los intestinos, guanilina y uroguanilina actúan como reguladores del equilibrio de fluidos y electrolitos. En respuesta a una alta ingesta oral de sal, estos péptidos se liberan a la luz del intestino en donde se unen a guanilato ciclasa C localizada en la membrana luminal de enterocitos (células epiteliales columnares sencillas del intestino delgado y colon). La unión de los péptidos de guanilina a guanilato ciclasa C induce excreción de electrolitos y agua al interior de la luz del intestino por medio de una compleja cascada de señalización intracelular que se inicia mediante un aumento en monofosfato de guanosina cíclico (GMPc).

La señalización mediada por GMPc que se inicia mediante los péptidos de guanilina es crítico para el funcionamiento normal del intestino. Cualquier anomalía en este proceso podría conducir a trastornos gastrointestinales tales como el síndrome de intestino irritable (SII), y enfermedades inflamatorias intestinales. La enfermedad inflamatoria intestinal es un nombre general dado a un grupo de trastornos que causan inflamación de los intestinos, que se caracteriza por un tejido rojo e inflamado. Ejemplos de tales enfermedades inflamatorias intestinales incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria grave que afecta predominantemente al ileon y al colon, pero también puede aparecer en otras secciones del tracto gastrointestinal. La colitis ulcerosa es exclusivamente una enfermedad inflamatoria del colon, el intestino grueso. A diferencia de la enfermedad de Crohn, en la que están implicadas todas las capas del intestino, y en la que puede haber intestino normal sano entre partes de intestino enfermo, la colitis ulcerosa afecta solo a la capa más interna (mucosa) del colon de una manera continua. Dependiendo de qué parte del tracto gastrointestinal está implicada, la enfermedad de Crohn se puede denominar ileítis, enteritis regional, colitis, etc. La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa difieren del colon espástico o del síndrome de intestino irritable, que son trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal. Se estima que tantos como 1.000.000 de estadounidenses se ven aquejados de enfermedad inflamatoria del intestino, pareciendo que pacientes masculinos y femeninos se ven afectados por igual. La mayoría de los casos se diagnostican antes de la edad de 30 años, pero la enfermedad puede producirse en la sexta, séptima y décadas posteriores de vida.

IBS y estreñimiento idiopático crónico son estados patológicos que pueden causar una gran incomodidad intestinal y angustia pero, a diferencia de las enfermedades inflamatorias intestinales, IBS no causa una inflamación grave o cambios en el tejido intestinal y no se cree que incremente el riesgo de cáncer colorrectal. En el pasado, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad celíaca e IBS estaban considerados como trastornos completamente distintos. Ahora, con la descripción de la inflamación, aunque sea leve, en IBS, y el solapamiento de síntomas entre IBS y la enfermedad celíaca, esta afirmación se ha cuestionado. La gastroenteritis bacteriana aguda es el principal factor de riesgo identificado hasta la fecha para el desarrollo posterior del síndrome del intestino irritable post-infeccioso. Los factores clínicos de riesgo incluyen una enfermedad aguda prolongada y la ausencia de vómitos. Una susceptibilidad determinada genéticamente a estímulos inflamatorios puede ser también un factor de riesgo para el síndrome del intestino irritable. La fisiopatología subyacente indica un aumento de la permeabilidad intestinal y una inflamación leve, así como una motilidad alterada y sensibilidad visceral. La serotonina (5-hidroxitriptamina [5-HT]) es un modulador clave de la función intestinal y se sabe que tiene un papel importante en la fisiopatología de IBS. La actividad de 5-HT está regulada por el GMPc.

Aunque las causas precisas de IBS y enfermedades inflamatorias del intestino (IBD) no se conocen, una alteración en el proceso de renovación continua de la mucosa gastrointestinal puede contribuir a la patología de la enfermedad en IBD y agravar IBS. El proceso de renovación del revestimiento gastrointestinal es un proceso dinámico y eficaz que implica la proliferación continua y la reposición de células dañadas de manera no deseada. Las tasas de proliferación de células que revisten la mucosa gastrointestinal son muy altas, en segundo lugar sólo por detrás del sistema hematopoyético. La homeostasis gastrointestinal depende de tanto la proliferación como la muerte celular

programada (apoptosis) de células epiteliales que revisten la mucosa del intestino. Se pierden continuamente células de las vellosidades en la luz del intestino y se reponen a una tasa sustancialmente igual mediante la proliferación de células en las criptas, seguido por su movimiento hacia arriba hasta las vellosidades. Las tasas de proliferación celular y apoptosis en el epitelio del intestino pueden aumentar o disminuir en una variedad de circunstancias, por ejemplo, en respuesta a estímulos fisiológicos tales como envejecimiento, señales inflamatorias, hormonas, péptidos, factores de crecimiento, productos químicos y hábitos dietéticos. Además, una tasa de proliferación potenciada está asociada frecuentemente con una reducción en el tiempo de recambio y una expansión de la zona proliferativa. El índice de proliferación es mucho más alto en estados patológicos tales como colitis ulcerosa y otros trastornos gastrointestinales. La hiperplasia intestinal es un promotor importante de inflamación gastrointestinal. La apoptosis y proliferación celular regulan juntas el número de células y determinan el índice de proliferación. Tasas de apoptosis reducidas están asociadas a menudo con crecimiento anómalo, inflamación y transformación neoplásica. Por tanto, tanto una proliferación aumentada como/o una muerte celular reducida pueden aumentar el índice de proliferación del tejido intestinal, lo que a su vez puede conducir a enfermedades inflamatorias gastrointestinales.

Además de un papel de uroguanilina y guanilina como moduladores de la secreción de iones y fluidos intestinales, estos péptidos también pueden estar implicados en la renovación continua de la mucosa gastrointestinal manteniendo el equilibrio entre proliferación y apoptosis. Por ejemplo, los péptidos de uroguanilina y guanilina parecen promover la apoptosis controlando el flujo de iones celular. Dada la prevalencia de estados inflamatorios en las sociedades occidentales, existe una necesidad de mejorar las opciones de tratamiento para estados inflamatorios, particularmente del tracto gastrointestinal. El documento WO2008/137318 describe el uso de un agente que reduce la absorción de sodio en el intestino y/o aumenta la secreción de aniones en el intestino, tal como un agonista del receptor de guanilato ciclasa C, en un método de reducción del riesgo de o de tratamiento de un trastorno asociado con la retención de fluido y/o sal en un paciente. Los documentos WO2006/086653 y WO2005/016244 se refieren a composiciones y métodos para tratar IBS y otros trastornos gastrointestinales, en los que las composiciones presentan péptidos que activan el receptor de guanilato ciclasa C (GC-C). El documento WO2002/078683 describe un método de tratamiento de pólipos que implica la administración de una composición de al menos un agonista de un receptor de guanilato ciclasa. Los documentos WO2009/149279, WO2008/151257 y WO2009/149278 se refieren a péptidos agonistas de guanilato ciclasa-C y a uso en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, inflamación o cáncer. El documento WO2004/052339 se refiere a un sistema de liberación controlada, dirigida, desencadenada por el pH.

### Sumario de la invención

En su sentido más amplio, la invención proporciona una materia tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. La divulgación proporciona una formulación de agonista de GCC para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno gastrointestinal en un sujeto que lo necesita que comprende:

(1) un núcleo, que contiene al menos un péptido agonista de GCC seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y 9; y o bien

(2)(i) uno o más polímeros dependientes del pH que se degradan en un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, en la que la formulación está optimizada para la administración del agonista de GCC al duodeno o yeyuno, o bien

(2)(ii) uno o más polímeros dependientes del pH que se degradan en un intervalo de pH de 5,5 a 6,5 o en un intervalo de pH de 6,5 a 7,5, en la que la formulación está optimizada para la administración del agonista de GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente; y opcionalmente

(3) un polímero hinchable, y/o una composición degradable

en la que cuando la formulación está optimizada para la administración del agonista de GCC al duodeno o yeyuno, la enfermedad o trastorno gastrointestinal se selecciona de síndrome del intestino irritable, dispepsia no ulcerosa, pseudoobstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudoobstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico, estreñimiento idiopático crónico, gastroparesia, pirosis, cáncer gástrico e infección por *H. pylori*, y cuando la formulación está optimizada para la administración del agonista de GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente, la enfermedad o trastorno gastrointestinal se selecciona de ileítis (ileítis posoperatoria), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, ileítis terminal y cáncer de colon.

Preferiblemente, el péptido agonista de GCC se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y 9.

Preferiblemente, la formulación es para una vía de administración oral.

El polímero dependiente del pH puede seleccionarse del grupo que consiste en un copolímero de ácido metacrílico, un poli(acetato-ftalato de vinilo), un ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, un acetato-trimelitato de celulosa, un acetato-ftalato de celulosa o un acetato-succinato de hidroxipropilometilcelulosa, preferiblemente un copolímero de ácido metacrílico, preferiblemente seleccionado de entre los polímeros EUDRAGIT, y lo más preferiblemente seleccionados de entre el grupo que consiste en EUDRAGIT L100, EUDRAGIT L-30D, EUDRAGIT S100,

EUDRAGIT FS 30D y EUDRAGIT L100-55, y combinaciones de los mismos.

La formulación puede comprender uno o más polímeros dependientes del pH y un polímero hinchable.

5 La formulación puede comprender dos polímeros dependientes del pH que se degradan en un intervalo de pH de 6,5 a 7,5 y en la que el polímero hinchable forma una capa entre los dos polímeros dependientes del pH.

10 El polímero hinchable puede seleccionarse del grupo que consiste en un copolímero acrílico, poli(acetato de vinilo) y derivados de celulosa, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en EUDRAGIT RL, EUDRAGIT RS y EUDRAGIT NE.

15 Opcionalmente, la formulación de agonista de GCC de la invención comprende además un agente de formación de poros, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, cloruro de sodio, cloruro de potasio, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, ácidos orgánicos solubles en agua, azúcares y alcohol de azúcar.

La formulación de agonista de GCC de la invención puede comprender una composición degradable, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en amilasa, quitosano, sulfato de condroitina, ciclodextrina, dextrano, goma guar, pectina y xilano.

20 La formulación de agonista de GCC de la invención puede comprender además un material seleccionado del grupo que consiste en acetato-ftalato de celulosa, acetato-succinato de hidroxilpropilmetilcelulosa, EUDRAGIT L100 y EUDRAGIT L30D-55, en la que el material forma un recubrimiento externo sobre la composición degradable.

25 La composición degradable puede ser una molécula portadora unida al agonista de GCC mediante un enlace covalente, preferiblemente un enlace azo o un enlace glicosídico, en la que el enlace covalente es estable en el estómago e intestino delgado pero lábil en el tracto gastrointestinal inferior, especialmente el colon.

30 La molécula portadora puede seleccionarse del grupo que consiste en un glucurónido, una ciclodextrina, un éster de dextrano o un aminoácido polar.

Opcionalmente, según la divulgación puede administrársele al sujeto un agente adicional seleccionado de

35 (i) una cantidad eficaz de un inhibidor de una fosfodiesterasa específica de GMPc, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en suldinac sulfona, zaprinast y motapizona, vardenifilo y sildenafil

(ii) una cantidad eficaz de al menos un laxante, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en SENNA, MIRALAX, PEG o policarbofilo de calcio

40 (iii) una cantidad eficaz de al menos un agente antiinflamatorio.

El sujeto puede ser un ser humano.

45 La formulación de agonista de GCC dirigida ofrece varias ventajas con respecto a otras formulaciones, especialmente formulaciones orales convencionales. Debido a que los agonistas de GCC pueden actuar potencialmente por todo el tracto gastrointestinal, las formulaciones orales convencionales destinadas a tratar IBD, por ejemplo, pueden presentar efectos secundarios debido a la actividad del agonista de GCC en tejidos no diana. Uno de tales efectos secundarios es la diarrea, que podría interferir con el tratamiento mediante un agonista de GCC de enfermedades del GI tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Las formulaciones orales convencionales también experimentan degradación o agregación del agonista de GCC en el estómago debido al entorno de pH bajo (Marx *et al.*, 1998 Peptide Res. 52:229-240; Chino *et al.*, 1998 FEBS Let. 421:27-31). En cambio, la formulación de agonista de GCC está optimizada para la liberación del agonista de GCC en el tejido diana, o bien el intestino delgado o bien el intestino grueso, dependiendo de la enfermedad o el trastorno que va a tratarse. Esto minimiza la exposición del péptido agonista de GCC a la acidez del estómago, reduciendo o eliminando de ese modo la degradación y agregación que se producen en condiciones de pH bajo. Otras ventajas incluyen menos efectos secundarios provocados por la actividad de GCC no deseada en tejidos no diana. Además, la formulación de agonista de GCC puede administrarse a una dosis eficaz menor que una forma de dosificación oral convencional.

60 Los péptidos agonistas de GCC son análogos de uroguanilina y péptidos ST bacterianos. Estos análogos tienen propiedades superiores en comparación con los péptidos "de tipo natural" o que se producen de manera natural. Los ejemplos de tales propiedades superiores incluyen una alta resistencia a la degradación en el extremo N-terminal y extremo C-terminal por carboxipeptidasas, aminopeptidasas y/o por otras enzimas proteolíticas presentes en los jugos intestinales humanos estimulados y jugos gástricos humanos.

65 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes y están abarcadas por la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

- Figura 1A: Actividad biológica de SP-304 incubado durante duraciones de tiempo variables en fluido gástrico simulado (SGF). La actividad biológica de SP-304 se determinó midiendo su capacidad para estimular la síntesis de GMPc en células T84. Se incubaron muestras durante 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente, se recogieron y se analizaron para determinar la actividad biológica, definiéndose la actividad de la muestra de 0 min como el 100% de actividad biológica. Las actividades de las otras muestras se muestran como porcentaje de actividad en relación con la actividad de la muestra de 0 min. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por triplicado  $\pm$  DE.
- Figura 1B: representación esquemática de análisis cromatográficos de HPLC de muestras de SP-304 tras la incubación con SGF durante 0 y 120 min, respectivamente. Las flechas muestran la posición de elución de SP-304.
- Figura 2A: Actividad biológica de SP-304 incubado durante duraciones de tiempo variables en fluido intestinal simulado (SIF). Se incubaron muestras de SP-304 durante 0, 30, 60, 90, 150 y 300 min, respectivamente, y entonces se sometieron a prueba para determinar su capacidad para estimular la síntesis de GMPc en células T84. La actividad de estimulación de GMPc en la muestra a 0 min de tiempo de incubación en SIF se tomó como el 100% de actividad biológica. Las actividades de las otras muestras de incubación de SP-304 se calcularon como el porcentaje de actividad en relación a la de la muestra de 0 min. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por triplicado  $\pm$  DE.
- Figura 2B: Espectros cromatográficos de HPLC de muestras de SP-304 tras la incubación con: (A) SIF inactivado por calor durante 300 minutos, o (B) SIF durante 120 minutos. Las flechas muestran la posición de elución de SP-304. El tratamiento con SIF eliminó completamente SP-304 tras una incubación de 2 g y apareció una señal de péptido, que eluía a 9,4 min, tal como se indica mediante \*.
- Figura 3: Representación esquemática de posibles productos de degradación de SP-304.
- Figura 4: Actividad biológica de péptidos truncados de SP-304 de 16 meros, tal como se mide mediante estimulación de la síntesis de GMPc en células T84. El péptido de 15 meros SP-338 es idéntico a SP-304 excepto porque carece de Leu en el extremo C-terminal. SP-327, SP-329 y SP-331 carecen de Leu en sus extremos C-terminales en relación con sus péptidos originales correspondientes, SP-326, SP-328 y SP-330, respectivamente. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por duplicado.
- Figura 5: Estimulación de la síntesis de GMPc en células T84 por SP-304 y análogos similares. Se expusieron células T84 a péptidos de prueba durante 30 min y entonces se usaron lisados celulares para determinar los niveles de GMPc intracelulares. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por triplicado  $\pm$  DE.
- Figura 6: Estimulación de la síntesis de GMPc en células T84 por SP-339 (linaclotida) y otros análogos de linaclotida. Se expusieron células T84 a péptidos de prueba durante 30 min y entonces se usaron lisados celulares para determinar los niveles de GMPc intracelulares. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por triplicado  $\pm$  DE.
- Figura 7A: Actividad biológica de SP-333 incubado durante duraciones de tiempo variables en fluido intestinal simulado (SIF). Se sometieron a prueba muestras de SP-333 incubadas durante 0, 5, 10, 30, 60 y 120 min, respectivamente, para determinar su capacidad para estimular la síntesis de GMPc en células T84. Se produjo la muestra de control marcada como C120 incubando SP-333 con SIF inactivado por calor durante 120 min. Se retiraron muestras de las incubaciones y se calentaron a 95°C durante 5 min para inactivar enzimas digestivas y entonces se usaron para estimular la síntesis de GMP cíclico en células T84. La actividad de estimulación de GMPc en la muestra a 0 min de tiempo de incubación en SIF se tomó como el 100% de actividad biológica. Las actividades de las otras muestras de incubación de SP-304 se calcularon como el porcentaje de actividad en relación con la de la muestra de 0 min. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por triplicado  $\pm$  DE.
- Figura 7B: Actividad biológica de SP-332 incubado durante duraciones de tiempo variables en fluido intestinal simulado (SIF). Se sometieron a prueba muestras de SP-333 incubadas durante 0, 5, 10, 30, 60 y 120 min, respectivamente, para determinar su capacidad para estimular la síntesis de GMPc en células T84. Se produjo la muestra de control marcada como C120 incubando SP-332 con SIF inactivado por calor durante 120 min. Se retiraron muestras de las incubaciones y se calentaron a 95°C durante 5 min para inactivar enzimas digestivas y entonces se usaron para estimular la síntesis de GMP cíclico en células T84. La actividad de estimulación de GMPc en la muestra a 0 min de tiempo de incubación en SIF se tomó como el 100% de actividad biológica. Las actividades de las otras muestras de incubación de SP-304 se calcularon como el porcentaje de actividad en relación con la de la muestra de 0 min. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por triplicado  $\pm$  DE.
- Figura 7C: Actividad biológica de SP-304 incubado durante duraciones de tiempo variables en fluido intestinal simulado (SIF). Se sometieron a prueba muestras de SP-304 incubadas durante 0, 10 y 60 min, respectivamente,

para determinar su capacidad para estimular la síntesis de GMPc en células T84. Se produjeron las muestras de control marcadas como C0 y C60 incubando SP-304 con SIF inactivado por calor durante 0 y 60 min, respectivamente. Se retiraron muestras de las incubaciones y se calentaron a 95°C durante 5 min para inactivar enzimas digestivas y entonces se usaron para estimular la síntesis de GMP cíclico en células T84. La actividad de estimulación de GMPc en la muestra a 0 min de tiempo de incubación en SIF se tomó como el 100% de actividad biológica. Las actividades de las otras muestras de incubación de SP-304 se calcularon como el porcentaje de actividad en relación con la de la muestra de 0 min. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por triplicado  $\pm$  DE.

Figura 7D: Cromatogramas de HPLC de SP-304 incubado durante 0 min en SIF (figura 7D-1) y 60 min en SIF (figura 7D-2), respectivamente. Las flechas indican las posiciones de elución de los péptidos SP-304 originales. Los datos muestran claramente que el pico de SP-304 que eluía a 14,3 min se desvaneció completamente y surgían dos nuevos picos a 7,4 y 10,3 minutos. Estos nuevos picos de péptidos representan productos de degradación de SP-304.

Figura 7E: Cromatogramas de HPLC de SP-332 incubado durante 0 min en SIF (figura 7E-1) y 120 min en SIF (figura 7E-2), respectivamente. Las flechas indican las posiciones de elución de los péptidos SP-332 originales. Los datos muestran que el péptido SP-332 que eluía a 14,8 minutos permaneció intacto tras la incubación con SIF durante 120 min, lo que sugiere que SP-332 es resistente a la proteólisis por proteasas presentes en SIF.

Figura 7F: Cromatogramas de HPLC de SP-333 incubado durante 0 min en SIF (figura 7F-1) y 120 min en SIF (figura 7F-2), respectivamente. Las flechas indican las posiciones de elución de los péptidos SP-333 originales. Los datos muestran que el péptido SP-333, que eluía a 14,8 minutos permaneció intacto tras la incubación con SIF, lo que sugiere que SP-333 es resistente a la proteólisis por proteasas presentes en SIF durante el periodo de incubación de 120 minutos.

Figura 7G: Incubación de SP-333 con SIF durante 2, 6, 12 y 24 h. Se determinó el efecto de la digestión con SIF sobre la actividad de SP-333 en ensayo de estimulación de T84 (figura 7G-1) y también se analizaron muestras mediante HPLC (figura 7G2-5). Las posiciones de elución del péptido original y sus metabolitos se indican mediante flechas.

Figura 8: Estimulación de la síntesis de GMPc en células T84 por los análogos pegilados de SP-333. Se expusieron células T84 a los péptidos indicados durante 30 min y se usaron lisados celulares para determinar los niveles de GMPc intracelulares. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por triplicado  $\pm$  DE.

Figura 9: Estimulación de la síntesis de GMPc en células T84 por SP-304 (0,1  $\mu$ M) o bien solo o bien en combinación con los inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) sulindac sulfona (100  $\mu$ M) o Zaprinast (100  $\mu$ M). Se expusieron células T84 a diversos tratamientos, tal como se indica, durante 30 min y se usaron los lisados celulares para determinar los niveles de GMPc intracelulares. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por duplicado.

Figura 10: Estimulación de la síntesis de GMPc en células T84 por SP-304 (0,1 ó 1,0  $\mu$ M) o bien solo o bien en combinación con concentraciones crecientes de inhibidores de fosfodiesterasa (PDE), tal como se indica. Se expusieron células T84 a diversos tratamientos, tal como se indica, durante 30 min y se usaron los lisados celulares para determinar los niveles de GMPc intracelulares. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por duplicado.

Figura 11: Estimulación de la síntesis de GMPc en T84 por SP-333 (0,1 ó 1,0  $\mu$ M) o bien solo o bien en combinación con concentraciones crecientes de Zaprinast, tal como se indica. Se expusieron células T84 a diversos tratamientos, tal como se indica, durante 30 min y se usaron los lisados celulares para determinar los niveles de GMPc intracelulares. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por duplicado.

Figura 12: Estimulación de la síntesis de GMPc en T84 por SP-333 (0,1  $\mu$ M) o bien solo o bien en combinación con concentraciones crecientes de sulindac sulfona, tal como se indica. Se expusieron células T84 a diversos tratamientos, tal como se indica, durante 30 min y se usaron los lisados celulares para determinar los niveles de GMPc intracelulares. Los puntos de datos mostrados son el promedio de mediciones por duplicado.

Figura 13: El tratamiento con SP-304 mejoró la consistencia de las deposiciones y elimina el bloqueo intestinal inducido por TNBS en un modelo murino de colitis inducida por TNBS.

Figura 14: El tratamiento con SP-304 estimuló un aumento del flujo de agua en la luz del tracto GI de monos cynomolgus.

Figura 15A-B: El efecto de la administración de SP-304 sobre la consistencia de las deposiciones en voluntarios humanos tal como se evalúa mediante la puntuación de Bristol del primer movimiento intestinal. Resultados de un

estudio de escalada de la dosis secuencial de fase 1, de sitio único, aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, de dosis única, creciente, oral de SP-304 en sujetos masculinos y femeninos sanos, en ayunas. Se utilizaron un total de 9 cohortes que utilizaban 8 sujetos por cohorte (6 SP-304; 2 placebos), totalizando 71 voluntarios a los que se les administró el fármaco. A cada cohorte se le administró una dosis única, oral o placebo coincidente administrado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) diluida 10 veces (240 ml). Las dosis de las nueve cohortes incluían 0,1, 0,3, 0,9, 2,7, 5,4, 8,1, 16,2, 24,3 y 48,6 mg de SP-304.

Figura 16: El efecto de la administración de SP-304 sobre el tiempo promedio hasta la primera deposición a lo largo de 24 horas tras la dosis en voluntarios humanos. Resultados de un estudio de escalada de la dosis secuencial de fase 1, de sitio único, aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, de dosis única, creciente, oral de SP-304 en sujetos masculinos y femeninos sanos, en ayunas. Se utilizaron un total de 9 cohortes que utilizaban 8 sujetos por cohorte (6 SP-304; 2 placebos), totalizando 71 voluntarios a los que se les administró el fármaco. A cada cohorte se le administró una dosis única, oral o placebo coincidente administrado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) diluida 10 veces (240 ml). Las dosis de las nueve cohortes incluían 0,1, 0,3, 0,9, 2,7, 5,4, 8,1, 16,2, 24,3 y 48,6 mg de SP-304.

Figura 17: SP-304 presentaba actividad superior en comparación con sulfasalazina para mejorar la inflamación en colitis inducida por DSS en ratones BDF-1.

Figura 18: SP-304 mostraba actividad superior en comparación con sulfasalazina para mejorar la inflamación en colitis inducida por TNBS en ratones BDF-1.

Figura 19: Determinación de la dosis de SP-304 que producía diarrea en monos. Se trataron dos grupos de monos, machos y hembras, con una única dosis de SP-304 al día de manera continua durante 28 días (para cada grupo, 0 y 75 mg/kg, n=5; 1, 10 mg/kg, n=4). Se indicaron cada día la consistencia de las deposiciones y la frecuencia intestinal. Los resultados se presentan como puntuación acumulada durante 28 días. La puntuación usada para la consistencia de las deposiciones fue tal como sigue: 0: sin deposiciones, 1: deposición normal, 2: Deposiciones sueltas/pastosas y 3: Diarrea/deposiciones líquidas.

Figura 20: SP-304 formulado para liberación dependiente del pH. Se llenaron cápsulas de gelatina con una cantidad calculada de SP-304 (10 mg/kg de peso corporal). Se recubrieron las cápsulas con o bien polímero EUDRAGIT L 30 D-55 (para liberación a un pH mayor de 5,5; n.º de lote B081214690) o polímero EUDRAGIT FSD (para liberación a un pH mayor de 7; n.º de lote G090365030). Se colocó una cápsula de cada formulación en un tubo de plástico que contenía 50 ml de disolución salina tampón ajustada a o bien pH 5,7 o bien pH 7,2. Se usaron cápsulas de gelatina que contenían la misma cantidad de SP-304 como controles. Se incubaron todos los controles en una disolución salina tamponada ajustada a pH 1,0. Se incubaron los tubos de plástico en un agitador rotatorio en un incubador a 37°C. Se extrajeron muestras (0,5 ml) del tubo a los intervalos de tiempo indicados y se sometieron inmediatamente a análisis de HPLC para determinar la liberación de SP-304 en la disolución. Se incubó la cápsula recubierta con polímero EUDRAGIT L 30 D-55 (para liberación a un pH mayor de 5,5) a pH 2,5 durante 60 min para imitar la exposición a la acidez del estómago. Se retiró la misma cápsula y se colocó en disolución salina tampón (pH 5,7) y se extrajeron muestras a diferentes tiempos para el análisis de HPLC. De manera similar, se incubó secuencialmente la cápsula recubierta con polímero EUDRAGIT FSD (para liberación a un pH mayor de 7) a pH 2,5 (60 min), pH 5,5 (60 min) y luego a pH 7,0 durante el intervalo de tiempo indicado para la toma de muestras.

Figura 21: Bioactividad de SP-304 formulado para liberación dependiente del pH. Se llenaron cápsulas de gelatina con una cantidad calculada de SP-304 (10 mg/kg de peso corporal). Se recubrieron las cápsulas con polímero EUDRAGIT siguiendo el procedimiento convencional para la liberación a pH o bien mayor de 5,5 o bien mayor de 7. Se colocó una cápsula de cada formulación en un tubo de plástico que contenía 50 ml de disolución salina tampón ajustada a o bien pH 5,7 o bien pH 7,2. Se usaron cápsulas de gelatina no recubiertas que contenían la misma cantidad de SP-304 como controles. Se incubaron los tubos de plástico en un agitador rotatorio en un incubador a 37°C. Se extrajeron muestras (0,5 ml) del tubo a los intervalos de tiempo indicados y se usaron inmediatamente para el bioensayo usando células T84 para determinar la liberación de SP-304 en la disolución. Se incubó la cápsula recubierta con polímero EUDRAGIT L 30 D-55 (para liberación a un pH mayor de 5,5) a pH 2,5 durante 60 min para imitar la exposición a la acidez del estómago. Se retiró la misma cápsula y se colocó en disolución salina tampón (pH 5,7) y se extrajeron muestras a diferentes tiempos para el bioensayo. De manera similar, se incubó secuencialmente la cápsula recubierta con polímero EUDRAGIT FSD (para liberación a un pH mayor de 7) a pH 2,5 (60 min), pH 5,5 (60 min) y luego a pH 7,0 durante el intervalo de tiempo indicado y se extrajeron muestras para el bioensayo.

Figura 22: La formulación para administrar SP-304 a un pH mayor de 7,0 redujo la incidencia de diarrea en monos. Se llenaron cápsulas de gelatina con SP-304 para producir una dosis de 10 mg/kg de peso corporal. Se recubrieron las cápsulas con polímero EUDRAGIT FSD. Se usaron cápsulas no recubiertas en el grupo de control de monos. Se evaluó el efecto del tratamiento sobre la consistencia de las deposiciones. Los resultados se expresan como puntuaciones acumuladas del número de incidencias de diarrea en los siete días de periodo de tratamiento.

Figura 23: La formulación para administrar SP-333 a un pH mayor de 7,0 redujo la incidencia de diarrea en monos.

Se llenaron cápsulas de gelatina con SP-333 para producir una dosis de 10 mg/kg de peso corporal. Se recubrieron las cápsulas con polímero EUDRAGIT FSD. Se usaron cápsulas no recubiertas en el grupo de control de monos. Se evaluó el efecto del tratamiento sobre la consistencia de las deposiciones. Los resultados se expresan como puntuaciones acumuladas del número de incidencias de diarrea en los siete días de periodo de tratamiento.

5

### Descripción detallada

La divulgación se refiere a formulaciones de agonistas de GCC que dirigen la liberación del agonista de GCC a una región específica del tracto gastrointestinal, concretamente o bien el intestino delgado proximal, preferiblemente el duodeno o yeyuno, o bien el intestino delgado distal o intestino grueso, preferiblemente el íleon, íleon terminal o colon ascendente. Las formulaciones de agonista de GCC de liberación dirigida son útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades y trastornos gastrointestinales. En particular, las formulaciones que se dirigen al duodeno o yeyuno son útiles para el tratamiento o la prevención de uno o más de los siguientes: síndrome del intestino irritable (preferiblemente estreñimiento predominante), dispepsia no ulcerosa, pseudoobstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudoobstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico, estreñimiento idiopático crónico, gastroparesia, pirosis, cáncer gástrico e infección por *H. pylori*. Asimismo, las formulaciones que se dirigen al íleon, íleon terminal o colon ascendente son útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades y trastornos específicos, incluyendo uno o más de los siguientes: ileítis (por ejemplo, ileítis posoperatoria), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, ileítis terminal y cáncer de colon.

Las formulaciones de GCC de liberación dirigida administran ventajosamente el agonista de GCC a la región del tracto gastrointestinal en donde tendrá su mayor efecto terapéutico. El agonista de GCC puede formularse para la administración específica al intestino delgado distal o al intestino grueso, preferiblemente el íleon, íleon terminal o colon ascendente. Esta formulación es particularmente útil para el tratamiento de indicaciones tales como colitis ulcerosa, en la que el uso de formulaciones orales convencionales de agonistas de GCC está limitada por la tendencia a producir diarrea. Esta reacción adversa se mitiga o elimina por las formulaciones de liberación dirigida en el presente documento, particularmente las que dirigen la liberación del agonista de GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente.

Enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (UC) son los principales síndromes abarcados por la clasificación de enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Aunque la CD puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, se produce lo más comúnmente en el íleon distal y colon, mientras que la UC por definición afecta sólo al colon. Con el fin de ejercer sus efectos terapéuticos antiinflamatorios, los agonistas de GCC administrados por vía oral deben alcanzar los sitios inflamados en el íleon distal y colon.

35

“Tratamiento” en este contexto se refiere a la inducción efectiva y mantenimiento de la remisión.

Se ha mostrado recientemente que el pH del intestino en pacientes con UC es generalmente más ácido en comparación con voluntarios sanos y también se ha postulado que estas variaciones pueden afectar a la administración en disolución mediada por pH del tratamiento farmacológico (véase Rubin, D.T. *et al.*, Colonic pH differs depending on the activity of ulcerative colitis (UC): Report of two patients with pH measurements over time. Póster presentado en la Annual Scientific Meeting de la American College of Gastroenterology, 23-28 de octubre de 2009, San Diego, CA, P1116). Además, el pH colónico se elevó sustancialmente entre la inflamación activa y la posterior quiescencia clínica (véase Rubin, D.T. *et al.*, Luminal pH and transit time in patients with quiescent ulcerative colitis (US) resembles that of healthy controls. Póster presentado en la Annual Scientific Meeting de la American College of Gastroenterology, 23-28 de octubre de 2009, San Diego, CA, P1114). Particularmente en UC, algunos pacientes no pudieron lograr la remisión con terapia ambulatoria convencional y este fracaso pudo deberse posiblemente a las diferencias fisiológicas en el tiempo de tránsito luminal y pH. Las formulaciones de agonista de GCC ventajosamente se diseñan específicamente para administrar agonistas de GCC bioactivos al íleon distal o colon de pacientes afectados utilizando una formulación de liberación dependiente del pH.

Otra propiedad ventajosa de las formulaciones de liberación dirigida es que se requiere una dosis eficaz inferior del agonista de GCC para lograr el mismo beneficio terapéutico que un agonista de GCC cuya liberación no está dirigida. La liberación dirigida del agonista de GCC garantiza además que la concentración de agonista sea máxima en su sitio de acción, reduciendo así los efectos secundarios que pueden estar asociados con la administración oral.

En una realización, la formulación de agonista de GCC es una formulación oral optimizada para la administración de un agonista de GCC al duodeno o yeyuno. En una realización específica, esta formulación comprende un núcleo, que contiene el agonista de GCC, rodeado por una o más capas de un material de direccionamiento. El material de direccionamiento se elige para proporcionar una liberación dirigida del agonista de GCC al duodeno o yeyuno. En una realización, la formulación comprende una capa externa de material de direccionamiento que comprende un polímero dependiente del pH que es estable en el entorno de pH bajo del estómago (pH 1-2) y comienza a disgregarse en un intervalo de pH de desde 4,5 hasta 5,5. Esta formulación protege a los agonistas de GCC del entorno ácido del estómago.

65

En otra realización, la formulación de agonista de GCC está optimizada para la administración de un agonista de

GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente. En una realización específica, esta formulación comprende un núcleo, que contiene el agonista de GCC, rodeado por una o más capas de un material de direccionamiento. El material de direccionamiento se elige para proporcionar una liberación dirigida del agonista de GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente. En una realización, la formulación comprende tres capas de material de direccionamiento: (1) una capa externa que comprende un polímero dependiente del pH que es estable en el entorno de pH bajo del estómago (pH 1-2) y comienza a disgregarse en un intervalo de pH de desde 6,5 hasta 7,5; (2) una capa media que comprende un polímero hinchable; y (3) una capa interna que comprende un polímero dependiente del pH que comienza a disgregarse en un intervalo de pH de desde 6,5 hasta 7,5. En una realización preferida, el polímero dependiente del pH se selecciona de entre los polímeros EUDRAGIT, por ejemplo, los polímeros EUDRATGIT L, S, FS y E. En una realización, el polímero hinchable es hidroxipropilmetilcelulosa.

Se prefieren análogos de agonistas de GCC de uroguanilina y péptidos ST bacterianos. Los análogos de uroguanilina y péptidos ST bacterianos tienen propiedades superiores en comparación con péptidos que se producen de manera natural, o "de tipo natural". Por ejemplo, la uroguanilina y péptidos ST bacterianos pueden modificarse para aumentar su resistencia a la degradación en el extremo N-terminal y extremo C-terminal frente a carboxipeptidasas, aminopeptidasas y/o por otras enzimas proteolíticas presentes en los jugos intestinales humanos estimulados y jugos gástricos humanos. La formulación de agonista de GCC comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1-44 y 99-107. En una realización preferida, el péptido consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1 y 9.

La invención proporciona una formulación de agonista de GCC para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos gastrointestinales y el aumento de la motilidad gastrointestinal en un sujeto que lo necesita administrando una cantidad eficaz de una formulación de agonista de GCC al sujeto. El término "tratar" tal como se usa en el presente documento se refiere a una reducción, una mejora parcial, alivio, o una mitigación de al menos un síntoma clínico asociado con los trastornos gastrointestinales que están tratándose. El término "prevenir" se refiere a una inhibición o retraso en la aparición o progresión de al menos un síntoma clínico asociado con los trastornos gastrointestinales que van a prevenirse. El término "cantidad eficaz" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad que proporciona alguna mejora o beneficio al sujeto. En determinadas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad que proporciona algo de alivio, mitigación y/o disminución en al menos un síntoma clínico del trastorno gastrointestinal que va a tratarse. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es la cantidad que proporciona algo de inhibición o retardo en la aparición o progresión de al menos un síntoma clínico asociado con el trastorno gastrointestinal que va a prevenirse. No es necesario que los efectos terapéuticos sean completos o curativos, siempre que se proporcione algún beneficio al sujeto. El término "sujeto" se refiere preferiblemente a un sujeto humano pero también puede referirse a un primate no humano u otro mamífero seleccionado preferiblemente de entre un ratón, una rata, un perro, un gato, una vaca, un caballo o un cerdo.

Los trastornos gastrointestinales que pueden tratarse o prevenirse incluyen, por ejemplo, síndrome del intestino irritable (IBS), dispepsia no ulcerosa, pseudoobstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudoobstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), inflamación por íleo (por ejemplo, íleo posoperatorio), gastroparesia, pirosis (alta acidez en el tracto GI), estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado con el uso de medicamentos tales como opioides, fármacos para la osteoartritis y fármacos para la osteoporosis), estreñimiento posquirúrgico y estreñimiento asociados con trastornos neuropáticos.

En una realización, la formulación de agonista de GCC está optimizada para la administración de un agonista de GCC al duodeno o yeyuno. Según esta realización, los trastornos gastrointestinales que pueden tratarse o prevenirse se seleccionan del grupo que consiste en síndrome del intestino irritable (preferiblemente estreñimiento predominante), dispepsia no ulcerosa, pseudoobstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudoobstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico, estreñimiento idiopático crónico, gastroparesia, pirosis, cáncer gástrico e infección por *H. pylori*.

En otra realización, la formulación de agonista de GCC está optimizada para la administración de un agonista de GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente. Según esta realización, los trastornos gastrointestinales que pueden tratarse o prevenirse se seleccionan del grupo que consiste en ileítis (por ejemplo, ileítis posoperatoria), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, ileítis terminal y cáncer de colon.

La formulación de agonista de GCC puede administrarse sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para prevenir o tratar inflamación, cáncer y otros trastornos, particularmente del tracto gastrointestinal. En una realización, la formulación de agonista de GCC se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de fosfodiesterasa, nucleótidos cíclicos (tales como GMPc y AMPc), un laxante (tal como SENNA, METAMUCIL, MIRALAX, PEG o policarbofilo de calcio), un ablandador de las deposiciones, una terapia contra el factor de necrosis tumoral alfa para IBD (tal como REMICADE, ENBREL o HUMAIRA) y fármacos antiinflamatorios (tales como inhibidores de COX-2, sulfasalazina, derivados de 5-ASA y AINE). En determinadas realizaciones, la formulación de agonista de GCC se administra en combinación con una dosis eficaz de un inhibidor de fosfodiesterasa específica de GMPc (cGMP-PDE) o bien simultáneamente o bien secuencialmente con dicho agonista de GCC. Los inhibidores de cGMP-PDE incluyen, por ejemplo, suldinac sulfona, zaprinast, motapizona, vardenifilo y sildenafil. En otra realización, la formulación de

agonista de GCC se administra en combinación con inhibidores de transportadores de nucleótidos cíclicos.

### 1.1 Formulaciones

5 Las formulaciones de agonista de GCC están optimizadas para la administración de un agonista de GCC a una región específica del tracto gastrointestinal. En una realización preferida, las formulaciones son formulaciones orales. Las formulaciones de la invención comprenden un núcleo, que contiene el agonista de GCC, y uno o más materiales de direccionamiento que pueden formar una o más capas alrededor del núcleo, o que pueden formarse en una matriz con el núcleo. El material de direccionamiento se elige para dirigir la liberación del agonista de GCC a  
10 una región específica del tracto gastrointestinal. El material de direccionamiento comprende preferiblemente uno de los siguientes: (1) un polímero dependiente del pH; (2) un polímero hinchable; o (3) una composición degradable. Se describen adicionalmente materiales de direccionamiento en las secciones 1.1.1 a 1.1.3 más adelante.

15 En una realización, el material de direccionamiento se elige para proporcionar la liberación dependiente del pH del agonista de GCC. En una realización preferida, el material de direccionamiento para una formulación de liberación dependiente del pH comprende un polímero dependiente del pH que es estable en el entorno de pH bajo del estómago (es decir, a pH 1-2) y comienza a disgregarse al pH del intestino delgado proximal (pH 4,5-6) o íleon distal (pH 7-8). Preferiblemente, el polímero dependiente del pH es un copolímero de ácido metacrílico seleccionado de entre los polímeros EUDRAGIT, que se describen adicionalmente más adelante en la sección 1.1.1.

20 En una realización, el material de direccionamiento se elige para proporcionar una liberación controlada (dependiente del tiempo) del agonista de GCC. En una realización preferida, el material de direccionamiento para una formulación de liberación controlada comprende al menos un polímero hinchable, tal como se describe adicionalmente más adelante en la sección 1.1.2.

25 En otra realización, el material de direccionamiento para una formulación de liberación controlada comprende una composición degradable tal como un polímero natural o sintético que es susceptible de degradarse por al menos una enzima bacteriana colónica. Preferiblemente, el agonista de GCC está incrustado en la matriz de polímero.

30 En otra realización, el material de direccionamiento para una formulación de liberación controlada comprende una composición degradable en forma de una molécula portadora conjugada covalentemente con el agonista de GCC mediante un enlace lábil que es estable en el estómago e intestino delgado pero que se degrada en el tracto gastrointestinal inferior, especialmente el colon, proporcionando de ese modo la liberación dirigida del agonista de GCC. Un agonista de GCC conjugado covalentemente con un portador de esta manera se denomina en el presente documento "profármaco" de GCC. Las formulaciones que comprende un profármaco de GCC se describen  
35 adicionalmente más adelante en la sección 1.1.3.

40 En determinadas realizaciones, la formulación está optimizada para la administración de un agonista de GCC al duodeno o yeyuno. En una realización, la formulación optimizada para la administración de un agonista de GCC al duodeno o yeyuno comprende un núcleo, que contiene el agonista de GCC, rodeado por una capa de direccionamiento compuesta por un polímero dependiente del pH que se degrada en un intervalo de pH de 4,5 a 5,5. Preferiblemente el polímero dependiente del pH es un copolímero de ácido metacrílico seleccionado de entre los polímeros EUDRAGIT.

45 En determinadas realizaciones, la formulación está optimizada para la administración de un agonista de GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente. En una realización, la formulación optimizada para la administración de un agonista de GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente comprende un núcleo, que contiene el agonista de GCC, rodeado por una, dos, tres o más capas de materiales de direccionamiento. Al menos un material de direccionamiento comprende un polímero dependiente del pH que se degrada en un intervalo de pH de 6,5 a 7,5. Preferiblemente el polímero dependiente del pH es un copolímero de ácido metacrílico seleccionado de entre los polímeros EUDRAGIT. Cuando hay más de una capa de materiales de direccionamiento rodeando al núcleo, al menos una comprende un polímero hinchable. Preferiblemente, el polímero hinchable es un copolímero acrílico, poli(acetato de vinilo) o un derivado de celulosa. En una realización, el polímero hinchable es un copolímero acrílico seleccionado de EUDRAGIT RL, EUDRAGIT RS y EUDRAGIT NE. En otra realización, el polímero hinchable es un  
50 derivado de celulosa seleccionado de etilcelulosa, acetato de celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa y sales de metal de carboximetilcelulosa. En otra realización, la formulación comprende EUDRACOL, que combina polímeros EUDRAGIT dependientes tanto del pH como del tiempo. Se describen polímeros EUDRAGIT en las secciones 1.1.1 y 1.1.2. Se describen ejemplos adicionales de polímeros hinchables más adelante en la sección 1.1.2.

60 El recubrimiento entérico elegido para la formulación es cualquier recubrimiento que logre el objetivo de direccionamiento de la formulación. Los ejemplos de recubrimientos entéricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: (1) polímeros acrílicos (polímeros aniónicos de ácido metacrílico y polímeros de metacrilatos con ácido metacrílico como grupo funcional) tal como los polímeros EUDRAGIT (Degussa), por ejemplo, para la liberación en el duodeno (disolución por encima de pH 5,5), EUDRAGIT L 100-55 y EUDRAGIT L 30 D-55; para la liberación en el yeyuno (disolución por encima de pH 6,0), EUDRAGIT L 100; para la liberación en el íleon  
65

(disolución por encima de pH 7), EUDRAGIT S 100 y EUDRAGIT FS 30, y COLORCON ACRIL-EZE; (2) poli(acetato-ftalato de vinilo) (PVAP) incluyendo el sistema de recubrimiento entérico acuoso COLORCON SURETERIC, y el sistema de recubrimiento entérico COLORCON OPADRY; (3) ftalato de hipromelosa, NF (ftalato de hidroxilpropilmetilcelulosa; HPMCP; HP-55 Shin-Etsu); (4) acetato-ftalato de celulosa (CAP), tal como AQUACOAT CPD; y (5) acetato-trimelitato de celulosa (CAT). Los ejemplos adicionales de recubrimientos entéricos adecuados incluyen, sin limitación, combinaciones de liberación sostenida tales como EUDRACOL, EUDRAPULSE, y EUDRAMODE, así como polímeros de liberación sostenida tales como los polímeros EUDRAGIT RL, RS y NE.

El núcleo que contiene agonista de GCC de una formulación puede estar en forma de un comprimido, una cápsula, gránulos, microgránulos o cristales. En determinadas realizaciones, el núcleo comprende micropartículas o microesferas. En una realización, el núcleo comprende una microesfera de acetato-butilato de celulosa. En algunas realizaciones, el núcleo se recubre con una o más capas de materiales de direccionamiento. En otras realizaciones, el núcleo se formula en una matriz con un material de direccionamiento. En determinadas realizaciones, la matriz de núcleo se recubre con al menos un material de direccionamiento adicional.

El núcleo que contiene agonista de GCC de las presentes formulaciones se forma según métodos reconocidos en la técnica. En una realización, el núcleo se forma con un agente de formación de microgránulos tal como celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa con baja sustitución, quitina, quitosano o cualquier combinación o mezcla de los mismos. Generalmente, una cantidad de agente de formación de microgránulos que es menor del 20% en peso da como resultado una mala esfericidad y una distribución de tamaño de partícula amplia. Por consiguiente, el agente de formación de microgránulos de las presentes formulaciones es preferiblemente al menos el 20% en peso. En determinadas realizaciones, el agente de formación de microgránulos está presente a del 20% al 95% o del 50% al 90% en peso.

La formulación de agonista de GCC puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes pueden comprender parte del núcleo o parte de una o más capas externas que rodean al núcleo. Preferiblemente, los excipientes están presentes en una cantidad del 2 al 70% o del 5 al 50% en peso. El término excipiente se refiere ampliamente a una sustancia biológicamente inactiva usada en combinación con los agentes activos de la formulación. Un excipiente puede usarse, por ejemplo, como agente de solubilización, agente estabilizante, diluyente, portador inerte, conservante, aglutinante, disgregante, agente de recubrimiento, agente aromatizante o agente colorante. Preferiblemente, se elige al menos un excipiente para proporcionar una o más propiedades físicas beneficiosas a la formulación, tales como aumento de la estabilidad y/o solubilidad del/de los agente(s) activo(s).

Un excipiente "farmacéuticamente aceptable" es uno que ha sido aprobado por una agencia reguladora estatal o federal para su uso en animales, y preferiblemente para su uso en seres humanos, o se enumera en la farmacopea estadounidense, la farmacopea europea u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y preferiblemente para su uso en seres humanos. Los ejemplos de excipientes incluyen determinadas proteínas inertes tales como albúminas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como ácido aspártico (que puede denominarse alternativamente aspartato), ácido glutámico (que puede denominarse alternativamente glutamato), lisina, arginina, glicina e histidina; ácidos grasos y fosfolípidos tales como sulfonatos de alquilo y caprilato; tensioactivos tales como dodecilsulfato de sodio y polisorbato; tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG); hidratos de carbono tales como glucosa, sacarosa, manosa, maltosa, trehalosa y dextrinas, incluyendo ciclodextrinas; polioles tales como sorbitol; agentes quelantes tales como EDTA; y contraiones formadores de sal tales como sodio. Se prefieren particularmente excipientes hidrófilos que reducen la actividad de unión de proteínas y la agregación de péptidos agonistas de GCC.

En algunas realizaciones, la formulación de agonista de GCC comprende además uno o más excipientes seleccionados de entre un potenciador de la absorción, un aglutinante, un disgregante, y un agente potenciador de la dureza. En otras realizaciones, la formulación comprende además uno o más excipientes seleccionados de entre un agente de capilaridad, un estabilizador, un agente de regulación del flujo, un lubricante, un antioxidante, un agente quelante o un secuestrante.

Los ejemplos no limitativos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, polivinilpirrolidona (POVIDONE), hidroxipropilcelulosa de bajo peso molecular, hidroxipropilmetilcelulosa de bajo peso molecular, carboximetilcelulosa de bajo peso molecular, etilcelulosa, gelatina, poli(óxido de etileno), goma arábiga, dextrina, silicato de aluminio y magnesio y polimetacrilatos. Los ejemplos no limitativos de un disgregante incluyen croscarmelosa sódica, crospovidona (PVP reticulada), carboximetilalmidón de sodio (glicolato sódico de almidón), almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio y silicato de aluminio y magnesio (Veegum). En determinadas realizaciones, se selecciona un aglutinante de polivinilpirrolidona y carboximetilcelulosa de sodio.

Los ejemplos no limitativos de un agente de capilaridad incluyen dióxido de silicio coloidal, caolín, óxido de titanio, dióxido de silicio pirogénico, alúmina, niacinamida, laurilsulfato de sodio, polivinilpirrolidona de bajo peso molecular, m-pirol, bentonita, silicato de aluminio y magnesio, poliéster, polietileno, y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, se selecciona un agente de capilaridad de laurilsulfato de sodio, dióxido de silicio coloidal y

polivinilpirrolidona de bajo peso molecular.

Los ejemplos no limitativos de un estabilizador incluyen butilhidroxianisol, ácido ascórbico, ácido cítrico, y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el estabilizador es una sustancia básica que puede elevar el pH de una disolución o dispersión acuosa de la formulación hasta al menos aproximadamente pH 6,8. Los ejemplos de tales sustancias básicas incluyen, por ejemplo, antácidos tales como aluminometasilicato de magnesio, aluminosilicato de magnesio, aluminato de magnesio, hidróxido de aluminio secado, hidrotalcita sintética, silicato de aluminio sintético, carbonato de magnesio, carbonato de calcio precipitado, óxido de magnesio, hidróxido de aluminio e hidrogenocarbonato de sodio. Otros ejemplos incluyen agentes reguladores del pH tales como L-arginina, fosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de sodio, fosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio, citrato de disodio, succinato de sodio, cloruro de amonio y benzoato de sodio. En determinadas realizaciones, se selecciona un estabilizador de ácido ascórbico y aluminometasilicato de magnesio.

En una realización en la que el estabilizador es una sustancia básica, la sustancia básica puede ser un compuesto soluble en agua inorgánico o un compuesto insoluble en agua inorgánico. Los ejemplos no limitativos de un compuesto soluble en agua inorgánico para su uso como estabilizador incluyen sales de carbonato tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de sodio o hidrogenocarbonato de potasio; sales de fosfato tales como fosfato de sodio anhidro, fosfato de potasio, fosfato dibásico de calcio o trifosfato de sodio; e hidróxidos de metales alcalinos, tales como hidróxido de sodio, potasio o litio. Los ejemplos no limitativos de compuestos insolubles en agua inorgánicos para su uso como estabilizador incluyen compuestos alcalinos adecuados que pueden conferir la basicidad requerida, tales como los comúnmente empleados en composiciones de antiácidos, por ejemplo, óxido de magnesio, hidróxido de magnesio, carbonato de magnesio, hidrogenocarbonato de magnesio, hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio o carbonato de calcio; compuestos de aluminio-magnesio compuestos, tales como hidróxido de aluminio y magnesio; compuestos de silicato tales como silicato de aluminio y magnesio (Veegum F), aluminometasilicato de magnesio (Nesulin FH2), aluminosilicato de magnesio (Nisulin A); y sales farmacéuticamente aceptables de ácido fosfórico tales como fosfato de calcio tribásico.

Los ejemplos no limitativos de agentes reguladores del flujo incluyen un dióxido de silicio coloidal y silicato de aluminio.

Los ejemplos no limitativos de un lubricante incluyen sales de estearato, tales como estearato de magnesio, estearato de calcio y estearato de sodio, ácido esteárico, talco, estearilfumarato de sodio, laurilsulfato de sodio, benzoato de sodio, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico), behenato de glicerol Compritol (behenato de glicerol), aceite de corola, palmitoestearato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado, óxido de magnesio, aceite mineral, poloxámero, y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, se selecciona un lubricante de talco y estearato de magnesio.

Los ejemplos no limitativos de antioxidantes incluyen 4,4(2,3-dimetiltetrametilendipirocatecol), extracto rico en tocoferol (vitamina E natural),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E sintética),  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol, butilhidroxinona, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo, galato de octilo, galato de dodecilo, butilhidroquinona terciaria (TBHQ), ácido fumárico, ácido málico, ácido ascórbico (vitamina C), ascorbato de sodio, ascorbato de calcio, ascorbato de potasio, palmitato de ascorbilo, estearato de ascorbilo, ácido cítrico, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de calcio, lactato de magnesio, anoxómero, ácido eritórbico, eritorbato de sodio, ácido eritorbínico, eritorbina de sodio, etoxiquina, glicina, goma guaiaac, citratos de sodio (citrato de monosodio, citrato de disodio, citrato de trisodio), citratos de potasio (citrato de monopotasio, citrato de tripotasio), lecitina, polifosfato, ácido tartárico, tartratos de sodio (tartrato de monosodio, tartrato de disodio), tartratos de potasio (tartrato de monopotasio, tartrato de dipotasio), tartrato de sodio y potasio, ácido fosfórico, fosfatos de sodio (monofosfato de sodio, difosfato de sodio, trifosfato de sodio), fosfatos de potasio (monofosfato de potasio, difosfato de potasio, trifosfato de potasio), etilendiaminatetraacetato de calcio y disodio (EDTA de calcio y disodio), ácido láctico, trihidroxibutirofenona y ácido tiodipropiónico.

En determinadas realizaciones, el núcleo de la formulación comprende un antioxidante y tanto un quelante como un secuestrante. El agente quelante actúa eliminando cantidades traza de metales que de lo contrario podrían unirse al agonista de GCC y provocar pérdida de actividad, por ejemplo a través de oxidación. El secuestrante tiene preferiblemente tiene varios grupos hidroxilo y/o ácido carboxílico que proporcionan un suministro de hidrógeno para la regeneración del radical libre del antioxidante inactivado. Los ejemplos no limitativos de agentes quelantes incluyen antioxidantes, edentato de dipotasio, edentato de disodio, edetato de calcio y disodio, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, maltol, edentato de sodio y edetato de trisodio. Los ejemplos no limitativos de secuestrantes incluyen ácido cítrico y ácido ascórbico.

En algunas realizaciones, la formulación comprende además una carga. Preferiblemente, la carga está presente en una cantidad de desde el 10% hasta el 85% en peso. Los ejemplos no limitativos de materiales adecuados para su uso como carga incluyen almidón, lactitol, lactosa, una sal de calcio inorgánica, celulosa microcristalina, sacarosa y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la carga comprende celulosa microcristalina. Preferiblemente, la celulosa microcristalina tiene un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 micrómetros, y lo más preferiblemente la celulosa microcristalina tiene un tamaño de partícula de aproximadamente

50 micrómetros.

En algunas realizaciones, el núcleo incluye opcionalmente un agente tamponante tal como un compuesto de sal inorgánica y un compuesto de sal alcalina orgánica. Los ejemplos no limitativos de un agente tamponante incluyen bicarbonato de potasio, citrato de potasio, hidróxido de potasio, bicarbonato de sodio, citrato de sodio, hidróxido de sodio, carbonato de calcio, fosfato de sodio dibásico, glutamato de monosodio, fosfato de calcio tribásico, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina, ácido cítrico monohidratado, ácido láctico, ácido propiónico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido málico y fosfato de sodio monobásico.

En algunas realizaciones, el núcleo comprende además un conservante. Los ejemplos no limitativos de un conservante incluyen un antioxidante, edentato de dipotasio, edentato de disodio, edetato de calcio y disodio, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, maltol, edentato de sodio y edentato de trisodio.

Las formulaciones de agonista de GCC están optimizadas preferiblemente para administración oral. Sin embargo, en algunas realizaciones, las formulaciones pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal. Pueden tratarse opcionalmente formas de dosificación orales sólidas con sistemas de recubrimiento (por ejemplo sistema de recubrimiento de película Opadry® fx, por ejemplo Opadry®) azul (OY-LS-20921), Opadry® blanco (YS-2-7063), Opadry® blanco (YS-1-7040) y tinta negra (S-1-8 106).

#### 1.1.1 Formulaciones de liberación dependiente del pH

En determinadas realizaciones, las formulaciones comprenden un material de direccionamiento dependiente del pH que es farmacológicamente inactivo, lo que significa que se excreta sin absorberse o metabolizarse. En algunas realizaciones, el núcleo cargado con agonista de GCC se recubre con un material dependiente del pH. En otras realizaciones, el material dependiente del pH comprende parte de una capa externa que rodea al núcleo, por ejemplo en determinadas realizaciones de una formulación de liberación controlada (dependiente del tiempo). En algunas realizaciones, el núcleo cargado con agonista de GCC se forma como una matriz con un material dependiente del pH. Preferiblemente, el material dependiente del pH comprende un polímero dependiente del pH.

Preferiblemente, el polímero dependiente del pH es estable en el entorno de pH bajo del estómago (es decir, a pH 1-2) y comienza a disgregarse al pH superior del intestino delgado (pH 6-7) o íleon distal (pH 7-8). En determinadas realizaciones, el polímero comienza a disgregarse a pH 4,5-4,8, pH 4,8-5,0, pH 5,0-5,2, pH 5,2-5,4, pH 5,4-5,8, pH 5,8-6,0, pH 6,0-6,2, pH 6,2-6,4, pH 6,4-6,6, pH 6,6-6,8, pH 6,8-7,0, pH 7,0-7,2 o pH 7,2-7,4. En determinadas realizaciones, el polímero comienza a disgregarse a pH 4,5-5,5, pH 5,5-6,5 o pH 6,5-7,5. El pH al que un polímero sensible al pH comienza a disgregarse también se denomina en el presente documento "pH umbral" del polímero.

En determinadas realizaciones, el polímero dependiente del pH es un copolímero de ácido metacrílico, un poli(acetato-ftalato de vinilo), un ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, un acetato-trimelitato de celulosa, un acetato-ftalato de celulosa o un acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa.

En una realización preferida, el polímero dependiente del pH es un copolímero de ácido metacrílico seleccionado de entre los polímeros EUDRAGIT. Los polímeros EUDRAGIT están disponibles en una amplia gama de diferentes concentraciones y formas físicas, incluyendo disoluciones acuosas, dispersión acuosa, disoluciones orgánicas y sustancias sólidas. Las propiedades farmacéuticas de los polímeros se determinan mediante las propiedades químicas de sus grupos funcionales. Por ejemplo, los polímeros EUDRAGIT L, S, FS y E tienen grupos ácidos o alcalinos que son dependientes del pH. Los recubrimientos entéricos de EUDRAGIT proporcionan protección frente a la liberación del agonista de GCC en el estómago y permiten una liberación controlada en el intestino. En determinadas realizaciones, se mezclan calidades aniónicas de EUDRAGIT que contienen grupos carboxilo entre sí para proporcionar liberación dependiente del pH del agonista de GCC. En determinadas realizaciones, se usan calidades de EUDRAGIT L y S para recubrimientos entéricos. En una realización, se usa EUDRAGIT FS 30D para la liberación controlada en el colon. Los diversos polímeros EUDRAGIT se describen adicionalmente en farmacopeas internacionales tales como Far. Eur., USP/NF, DMF y JPE.

En realizaciones específicas, el polímero dependiente del pH es un copolímero de ácido metacrílico seleccionado de EUDRAGIT L100, que tiene un pH umbral de 6,0; EUDRAGIT S100, que tiene un pH umbral de 7,0; EUDRAGIT L-30D, que tiene un pH umbral de 5,6; EUDRAGIT FS 30D, que tiene un pH umbral de 6,8; o EUDRAGIT L100-55, que tiene un pH umbral de 5,5, o una combinación de los mismos.

#### 1.1.2 Formulaciones de liberación controlada

En una realización, la formulación de agonista de GCC comprende un material de direccionamiento que proporciona una liberación controlada (dependiente del tiempo) del agonista de GCC. La liberación controlada en este contexto incluye liberación sostenida retardada, liberación controlada retardada, liberación lenta retardada, liberación prolongada retardada, liberación extendida retardada y una liberación súbita o "estallido".

Preferiblemente, la formulación de liberación controlada comprende un núcleo de disgregación lenta que comprende el agonista de GCC rodeado por el material de direccionamiento. El material de direccionamiento comprende preferiblemente al menos un polímero hinchable. Los ejemplos no limitativos de polímeros hinchables para su uso en una formulación de liberación controlada de la invención incluyen copolímeros acrílicos, por ejemplo, EUDRAGIT RL, EUDRAGIT RS o EUDRAGIT NE; poli(acetato de vinilo), por ejemplo, KOLLICOAT SR 30D; y derivados de celulosa tales como etilcelulosa o acetato de celulosa, por ejemplo, SURELEASE y AQUACOAT ECD. En una realización preferida, el material de direccionamiento comprende uno o más de EUDRAGIT RL, EUDRAGIT RS o EUDRAGIT NE para proporcionar liberación temporal controlada del agonista de GCC mediante hinchamiento independiente del pH. En una realización particular, el material de direccionamiento comprende EUDRAGIT RL:RS (2:8) y un recubrimiento externo que comprende EUDRAGIT FS.

Además los ejemplos no limitativos de polímeros hinchables que pueden usarse en las formulaciones de liberación sostenida de la invención incluyen poli(metacrilato de hidroxialquilo) que tiene un peso molecular de desde 30.000 hasta 5.000.000; kappa-carragenano; polivinilpirrolidona que tiene un peso molecular de desde 10.000 hasta 360.000; hidrogeles aniónicos y catiónicos; complejos de polielectrolitos; poli(alcohol vinílico) que tiene bajas cantidades de acetato, reticulado con glicoxal, formaldehído o glutaraldehído y que tiene un grado de polimerización desde 200 hasta 30.000; una mezcla que comprende metilcelulosa, agar reticulado y carboximetilcelulosa; un copolímero insoluble en agua, hinchable en agua producido formando una dispersión de anhídrido maleico finamente dividido con estireno, etileno, propileno, butileno o isobutileno; polímeros hinchables en agua de N-vinil-lactamas; polisacárido, gomas hinchables en agua, hidroxilpropilmetilcelulosa de alta viscosidad y/o mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, el polímero hinchable se selecciona del grupo que consiste en pectinato de calcio, polisacárido reticulado, almidón insoluble en agua, celulosa microcristalina, péptido reticulado insoluble en agua, proteína reticulada insoluble en agua, gelatina reticulada insoluble en agua, gelatina hidrolizada reticulada insoluble en agua, colágeno reticulado insoluble en agua, celulosa modificada y poli(ácido acrílico reticulado). Los ejemplos no limitativos de un polisacárido reticulado incluyen sales de metal insolubles o derivados reticulados de alginato, pectina, goma xantana, goma guar, goma tragacanto y goma de algarrobo, carragenano, sales de metal de los mismos, y derivados reticulados covalentemente de los mismos. Los ejemplos no limitativos de celulosa modificada incluyen derivados reticulados de hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa y sales de metal de carboximetilcelulosa.

En determinadas realizaciones, el núcleo hinchable también comprende un agente de capilaridad tal como dióxido de silicio. El agente de capilaridad también puede seleccionarse de un disgregante tal como celulosa microcristalina para potenciar la velocidad de captación de agua. Otros agentes de capilaridad adecuados incluyen, pero no se limitan a, caolín, dióxido de titanio, dióxido de silicio pirogénico, alúmina, niacinamida, laurilsulfato de sodio, polivinilpirrolidona de bajo peso molecular, m-pirol, bentonita, silicato de aluminio y magnesio, poliéster, polietileno, y mezclas de los mismos.

En determinadas realizaciones, el material de direccionamiento, que puede comprender parte del núcleo y/o formar una o más capas que recubren el núcleo, comprende opcionalmente además al menos uno de un lubricante, un agente promotor del flujo, un plastificante, un agente antiadherencia, tensioactivo, agente humectante, agente de suspensión y agente de dispersión.

En determinadas realizaciones, el material de direccionamiento comprende un polímero insoluble en agua y un agente de formación de poros. Los ejemplos no limitativos de agentes de formación de poros incluyen sacarosa, cloruro de sodio, cloruro de potasio, polivinilpirrolidona y/o polietilenglicol, ácidos orgánicos solubles en agua, azúcares y alcohol de azúcar. En determinadas realizaciones, el agente de formación de poros forma parte de una capa externa o recubrimiento. En otras realizaciones, el agente de formación de poros se distribuye uniformemente por todo el polímero insoluble en agua.

En una realización, el material de direccionamiento comprende un recubrimiento de compresión. Los ejemplos no limitativos de materiales que pueden usarse como recubrimiento de compresión incluyen una goma seleccionada del grupo que consiste en goma xantana, goma de algarrobo, galactanos, mananos, alginatos, goma karaya, pectina, agar, tragacanto, goma arábica, carragenano, tragacanto, quitosano, agar, ácido alginico, hidrocoloides de *Acacia catechu*, salai guggal, bodellum de la India, goma copaiba, asafetida, goma cambi, *Enterolobium cyclocarpum*, goma mástica, goma benzoína, sandaraca, goma gambier, *Butea frondosa* (llama de goma forestal), mirra, manano de Konjak, goma guar, goma welan, goma gellan, goma tara, goma de algarrobo, goma de carragenano, glucomanano, goma de galactano, alginato de sodio, tragacanto, quitosano, goma xantana, goma xantana desacetilada, pectina, polipectato de sodio, gluten, goma karaya, goma de tamarindo, goma ghatti, goma acaroides/yacca/roja, goma dammar, goma de enebro, goma de éster, goma de semilla de ipil-ipil, goma talha (acacia seyal) y gomas de células vegetales cultivadas incluyendo las de las plantas de los géneros: *Acacia*, *Actinidia*, *Aptenia*, *Carbobrotus*, *Chickorium*, *Cucumis*, *Glicina*, *Hibiscus*, *Hordeum*, *Letuca*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Medicago*, *Mesembryanthemum*, *Oryza*, *Panicum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poliathus*, *Policarbophil*, *Sida*, *Solanum*, *Trifolium*, *Trigonella*, goma de semilla de *Azalia africana*, goma de *Treulia africana*, goma detarium, goma cassia, goma carob, goma de *Prosopis africana*, goma de *Colocassia esulenta*, goma de *Hakea gibbosa*, goma khaya, escleroglucano y zea, así como mezclas de los anteriores.

En algunas realizaciones, el material de direccionamiento comprende además un plastificante, un agente espesante, un agente humectante, un agente de suspensión o un agente de dispersión, o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitativos de un plastificante incluyen sebacato de dibutilo, polietilenglicol y polipropilenglicol, ftalato de dibutilo, ftalato de dietilo, citrato de trietilo, citrato de tributilo, monoglicérido acetilado, citrato de acetiltributilo, triacetina, ftalato de dimetilo, benzoato de bencilo, ésteres butílicos y/o de glicol de ácidos grasos, aceites minerales refinados, ácido oleico, aceite de ricino, aceite de maíz, alcanfor, glicerol y sorbitol o una combinación de los mismos. En una realización, el agente de espesamiento comprende alcohol cetílico. Los ejemplos no limitativos de agentes humectantes incluyen un poloxámero, éteres de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioxietilen-sorbitano, estearato de polioximetileno, laurilsulfato de sodio, ésteres de ácidos grasos de sorbitano, cloruro de benzalconio, aceite de ricino polietoxilado y docusato de sodio. Los ejemplos no limitativos de agentes de suspensión incluyen ácido algínico, bentonita, carbómero, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, celulosa microcristalina, dióxido de silicio coloidal, dextrina, gelatina, goma guar, goma xantana, caolín, silicato de aluminio y magnesio, maltitol, triglicéridos de cadena media, metilcelulosa, ésteres de ácidos grasos de polioxietilen-sorbitano, polivinilpirrolidona, alginato de propilenglicol, alginato de sodio, ésteres de ácidos grasos de sorbitano y tragacanto. Los ejemplos no limitativos de agentes de dispersión incluyen poloxámero, ésteres de ácidos grasos de polioxietilen-sorbitano y ésteres de ácidos grasos de sorbitano.

En determinadas realizaciones, la formulación de liberación dirigida comprende además un recubrimiento entérico externo sobre el material de liberación dirigida. Preferiblemente, el recubrimiento entérico se selecciona del grupo que consiste en acetato-ftalato de celulosa, acetato-succinato de hidroxilpropilmetilcelulosa, EUDRAGIT L100 y EUDRAGIT L30D-55.

#### 1.1.2.1 Formulación de estallido

En una realización, la formulación de agonista de GCC es una formulación retardada en el tiempo diseñada para liberar el agonista de GCC en un estallido rápido en el colon o intestino delgado ("formulación de estallido"). La formulación comprende un núcleo y una capa externa. El núcleo comprende al menos un agonista de GCC y al menos un agente de control del estallido. En determinadas realizaciones, el núcleo comprende además al menos un disgregante seleccionado del grupo que consiste en croscarmelosa sódica, crospovidona (PVP reticulada), carboximetilalmidón de sodio (glicolato sódico de almidón), carboximetilcelulosa de sodio reticulada (croscarmelosa), almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio y silicato de aluminio y magnesio, o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, el núcleo comprende además al menos uno de un potenciador de la absorción, un aglutinante, un agente potenciador de la dureza, un agente tamponante, una carga, un agente de regulación del flujo, un lubricante, un agente sinérgico, un quelante, un antioxidante, un estabilizador y un conservante. Opcionalmente, el núcleo también comprende uno o más de otros excipientes.

El agente de control del estallido en el núcleo comprende preferiblemente un polímero insoluble en agua para controlar la tasa de penetración de agua en el núcleo y elevar la presión interna (presión osmótica) dentro del núcleo. Un agente de control del estallido de este tipo preferiblemente puede hincharse tras el contacto con un líquido. Los ejemplos no limitativos de polímeros insolubles en agua adecuados incluyen polisacárido reticulado, almidón insoluble en agua, celulosa microcristalina, péptido reticulado insoluble en agua, proteína reticulada insoluble en agua, gelatina reticulada insoluble en agua, gelatina hidrolizada reticulada insoluble en agua, celulosa modificada con colágeno reticulada insoluble en agua y poli(ácido acrílico) reticulado. En una realización, el polímero insoluble en agua es un polisacárido reticulado seleccionado del grupo que consiste en sales de metal insolubles o derivados reticulados de alginato, pectina, goma xantana, goma guar, goma tragacanto y goma de algarrobo, carragenano, sales de metal de los mismos, y derivados reticulados covalentemente de los mismos. En una realización, el polímero insoluble en agua es una celulosa modificada seleccionada del grupo que consiste en derivados reticulados de hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa y sales de metal de carboximetilcelulosa. En otra realización, el polímero insoluble en agua se selecciona de pectinato de calcio, celulosa microcristalina, o una combinación de los mismos.

La capa externa comprende un portador hidrófobo insoluble en agua y un agente de formación de poros compuesto por una materia particular hidrófila insoluble en agua. El agente de formación de poros es un agente permeable al agua que permite la entrada de líquido dentro del núcleo. Opcionalmente, la capa externa comprende además al menos uno de un agente humectante, un agente de suspensión, un agente de dispersión, un agente de espesamiento y un plastificante.

En determinadas realizaciones, el portador hidrófobo insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en un copolímero de acrilato de dimetilaminoetilo/metacrilato de etilo, basándose el copolímero en ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos amonio cuaternario, en el que la razón molar de los grupos amonio con respecto a los ésteres de ácido (met)acrílico neutros restantes es de aproximadamente 1:20, el polímero correspondiente a USP/NF "copolímero de metacrilato de amonio tipo A", un copolímero de metacrilato de etilo/metacrilato de clorotrimetilamonioetilo, basándose el copolímero en ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos amonio cuaternario en el que la razón molar de los grupos amonio con respecto a los ésteres de ácido (met)acrílico neutros restantes es de 1:40, el polímero correspondiente a USP/NF "copolímero de

metacrilato de amonio tipo B”, un copolímero de metacrilato de dimetilaminoetilo/metacrilato de metilo y metacrilato de butilo, un copolímero basado en ésteres de metacrilato de dimetilaminoetilo y ésteres de ácido metacrílico neutros en el que el polímero es catiónico en presencia de ácidos, un copolímero de acrilato de etilo y acrilato de metilo/metacrilato de etilo y metilacrilato de metilo, siendo el copolímero un copolímero neutro basado en ésteres de ácido acrílico y ácido metacrílico neutros, etilcelulosa, laca, zeína y ceras.

En determinadas realizaciones, la materia particulada insoluble en agua es un polímero insoluble en agua aunque hidrófilo, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un polisacárido reticulado insoluble en agua, una proteína reticulada insoluble en agua, un péptido reticulado insoluble en agua, gelatina reticulada insoluble en agua, gelatina hidrolizada reticulada insoluble en agua, colágeno reticulado insoluble en agua, poli(ácido acrílico) reticulado insoluble en agua, derivados de celulosa reticulados insolubles en agua, polivinilpirrolidona reticulada insoluble en agua, celulosa microcristalina, almidón insoluble, almidón microcristalino y una combinación de los mismos. Lo más preferiblemente, la materia particulada insoluble en agua es celulosa microcristalina.

En determinadas realizaciones, la formulación de estallido comprende además un recubrimiento entérico sobre la capa externa. El recubrimiento entérico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en acetato-ftalato de celulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, y un polímero EUDRAGIT tal como EUDRAGIT L100 o EUDRAGIT L30D-55.

### 1.1.3 Formulaciones biodegradables

En una realización, la formulación de agonista de GCC comprende un polímero natural o sintético que es susceptible de degradarse por al menos una enzima bacteriana colónica. Preferiblemente, el agonista de GCC se incrusta en la matriz de polímero. Los ejemplos no limitativos de tales polímeros incluyen polímeros de polisacáridos tales como amilasa, quitosano, sulfato de condroitina, ciclodextrina, dextrano, goma guar, pectina y xilano. Preferiblemente, el polímero natural o sintético se gelifica o se reticula con un catión tal como un catión de zinc, por ejemplo de sulfato de zinc, cloruro de zinc o acetato de zinc. La formulación está preferiblemente en forma de perlas reticuladas iónicamente que posteriormente se recubren con un recubrimiento entérico. El recubrimiento entérico puede comprender cualquier material de recubrimiento entérico adecuado, tal como ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, poli(acetato-ftalato de vinilo), acetato-ftalato de celulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, ácido algínico y alginato de sodio, o un polímero EUDRAGIT.

En otra realización, la formulación de agonista de GCC comprende un agonista de GCC conjugado covalentemente con una molécula portadora de manera que el enlace covalente entre el agonista de GCC y el portador es estable en el estómago e intestino delgado pero lábil en el tracto gastrointestinal inferior, especialmente el colon. El agonista de GCC covalentemente unido a una molécula portadora se denomina “profármaco de GCC”. En determinadas realizaciones, el profármaco de GCC comprende un agonista de GCC conjugado covalentemente con una molécula portadora por medio de un enlace azo o un enlace glicosídico. En otras realizaciones, el profármaco de GCC comprende un glucurónido, una ciclodextrina, un éster de dextrano o un aminoácido polar. En determinadas realizaciones, el profármaco de GCC es un profármaco polimérico. En una realización, el profármaco polimérico comprende poliamidas que contienen grupos azo.

### 1.2 Agonistas de GCC

Los agonistas de GCC para su uso en las formulaciones y usos médicos en el presente documento descrito se unen a guanilato ciclasa C y estimulan la producción intracelular de GMPc. Opcionalmente, los agonistas de GCC inducen la apoptosis e inhiben la proliferación de células epiteliales. El término “guanilato ciclasa C” se refiere a una forma transmembrana de guanilato ciclasa que actúa como receptor intestinal para los péptidos de toxina estables térmicamente (ST) secretados por bacterias entéricas. La guanilato ciclasa C es también el receptor para los péptidos que se producen de manera natural guanilia y uroguanilina. La posibilidad de que pueda haber diferentes receptores para cada uno de estos péptidos no se ha excluido. Por tanto, el término “guanilato ciclasa C” también puede abarcar una clase de receptores de guanilato ciclasa transmembrana expresados en células epiteliales que revisten la mucosa gastrointestinal.

El término “agonista de GCC” se refiere a tanto compuestos peptídicos como no peptídicos tales como los que se unen a una guanilato ciclasa C intestinal y estimulan la producción intracelular de GMPc. Cuando el agonista de GCC es un péptido, el término abarca fragmentos biológicamente activos de tales péptidos y propéptidos que se unen a guanilato ciclasa C y estimulan la producción intracelular de GMPc.

Preferiblemente, los agonistas de GCC estimulan la producción de GMPc intracelular a niveles mayores que agonistas de GCC que se producen de manera natural tales como uroguanilina, guanilia y péptidos ST. En algunas realizaciones, los agonistas de GCC estimulan la producción de GMPc intracelular a niveles mayores que el péptido designado SP-304 (SEQ ID NO:1). En realizaciones específicas, un agonista de GCC para su uso en las formulaciones y los métodos de la invención estimula el 5%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 75%, el 90% o más GMPc intracelular en comparación con uroguanilina, guanilia, linfoguanilina, linaclotida, péptidos ST o SP-304. Los términos “inducir” y “estimular” se usan de manera intercambiable a lo largo de toda la memoria descriptiva.

Preferiblemente, los agonistas de GCC son más estables que agonistas de GCC que se producen de manera natural tales como uroguanilina, guanilina y péptidos ST. En algunas realizaciones, los agonistas de GCC son más estables que el péptido designado SP-304. "Estabilidad" en este contexto se refiere a resistencia a la degradación en fluido gastrointestinal y/o fluido intestinal (o fluidos gastrointestinal o intestinal estimulados) en comparación con el péptido de referencia. Por ejemplo, los agonistas de GCC para su uso en las formulaciones y los métodos de la invención preferiblemente se degradan el 2%, el 3%, el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 75%, el 90% o menos en comparación con agonistas de GCC que se producen de manera natural y/o SP-304.

10 Los agonistas de GCC son péptidos.

Se describen ejemplos específicos de péptidos agonistas de GCC en las tablas I-VII más adelante. Tal como se usa en las tablas I-VII, los términos "PEG3" o "3PEG" se refieren a un polietilenglicol tal como ácido aminoetiloxi-etiloxi-acético ácido (AeeA), y polímeros del mismo. El término "X<sub>aa</sub>" se refiere a cualquier aminoácido natural o no natural o análogo de aminoácido. El término "M<sub>aa</sub>" se refiere a una cisteína (Cys), penicilamina (Pen) homocisteína o 3-mercaptoprolina. El término "Xaa<sub>n1</sub>" pretende indicar una secuencia de aminoácidos de cualquier aminoácido natural o no natural o análogo de aminoácido que tiene uno, dos o tres residuos de longitud; Xaa<sub>n2</sub> pretende indicar una secuencia de aminoácidos que no tiene ningún residuo o un residuo de longitud; y Xaa<sub>n3</sub> pretende indicar una secuencia de aminoácidos de cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de longitud. Adicionalmente, cualquier aminoácido representado por Xaa, Xaa<sub>n1</sub>, Xaa<sub>n2</sub> o Xaa<sub>n3</sub> puede ser un L-aminoácido, un D-aminoácido un aminoácido metilado o cualquier combinación de los mismos. Opcionalmente, cualquier péptido agonista de GCC representado por las fórmulas I a XX en las tablas puede contener uno o más residuos de polietilenglicol en el extremo N-terminal, extremo C-terminal o ambos.

25 La formulación de agonista de GCC de la invención comprende un péptido seleccionado de SEQ ID NO: 1-44 y 99-107, cuyas secuencias se exponen más adelante en las tablas I a VII más adelante. En una realización, una formulación de agonista de GCC comprende el péptido designado por SEQ ID NO: 1 ó 9.

#### 30 1.2.1 Péptidos agonistas de GCC

Los agonistas de GCC son péptidos agonistas de GCC. En determinadas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC son análogos de uroguanilina o un péptido ST bacteriano. La uroguanilina es una hormona peptídica circulante con actividad natriurética. Un péptido ST es un miembro de una familia de enterotoxinas termoestables (péptidos ST) secretadas por cepas patógenas de *E. coli* y otras bacterias entéricas que activan el receptor de la guanilato ciclasa y causan diarrea secretora. A diferencia de los péptidos ST bacterianos, la unión de la uroguanilina al receptor de la guanilato ciclasa depende del pH fisiológico del intestino. Por lo tanto, se espera que la uroguanilina regule el transporte de fluidos y de electrolitos en una manera dependiente del pH y sin causar diarrea grave.

Los péptidos agonistas de GCC pueden ser polímeros de L-aminoácidos, D-aminoácidos, o una combinación de ambos. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los péptidos son péptidos D retro-inversos. La expresión "isómero retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el que la dirección de la secuencia se invierte y la quiralidad de cada residuo de aminoácido está invertida. Véase, por ejemplo, Jameson *et al.*, Nature, 368, 744-746 (1994); Brady *et al.*, Nature, 368, 692-693 (1994). El resultado neto de la combinación de D-enantiómeros y la síntesis inversa es que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amida se intercambian, mientras que se conserva la posición de los grupos de la cadena lateral en cada carbono alfa. A menos que se establezca específicamente otra cosa, se supone que cualquier secuencia dada de L-aminoácido se puede convertir en un péptido D retro-inverso mediante la síntesis de una secuencia inversa para la secuencia natural de L-aminoácidos correspondiente.

Los péptidos agonistas de GCC pueden inducir la producción de GMPc en células y tejidos que expresan guanilato ciclasa C. En determinadas realizaciones, el péptido agonista de GCC estimula 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o más el GMPc intracelular, en comparación con agonistas de GCC de origen natural. Opcionalmente, los péptidos agonistas de GCC estimulan 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o más el GMPc intracelular, en comparación con SP-304 (SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones, el péptido GCRA estimula la apoptosis, por ejemplo, la muerte celular programada o activa el regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR).

En algunas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC son más estables que los agonistas de GCC que se producen de manera natural y/o SP-304 (SEQ ID NO: 1), SP-339 (linaclotida) (SEQ ID NO: 55) o SP-340 (SEQ ID NO: 56). Por ejemplo, el péptido agonista de GCC se degrada el 2%, el 3%, el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 75%, el 90% o menos en comparación con agonistas de GCC que se producen de manera natural y/o SP-304, SP-339 (linaclotida) o SP-340. En determinadas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC para su uso en las formulaciones y métodos de la invención son más estables frente a la digestión proteolítica que agonistas de GCC que se producen de manera natural y/o SP-304 (SEQ ID NO: 1), SP-339 (linaclotida) (SEQ ID NO: 55) o SP-340 (SEQ ID NO: 56). En una realización, un péptido agonista de GCC se pegila con el fin de hacer que los péptidos sean más resistentes hacia la proteólisis por enzimas del tracto gastrointestinal. En una realización

preferida, el péptido agonista de GCC se pega con el grupo ácido aminoetiloxi-etiloxi-acético (Aeea) en su extremo C-terminal, en su extremo N-terminal, o en ambos extremos.

5 Los ejemplos específicos de péptidos agonistas de GCC que pueden usarse en la invención incluyen un péptido seleccionado del grupo designado por SEQ ID NO: 1-44 y 99-107.

En determinadas realizaciones, uno o varios aminoácidos de los péptidos agonistas de GCC se pueden reemplazar por un aminoácido de origen artificial o un análogo de aminoácido natural o artificial. Tales aminoácidos o análogos de aminoácidos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Hunt, "The Non-Protein Amino Acids: In Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids", Barrett, Chapman and Hall, 1985). En algunas realizaciones, un aminoácido se puede reemplazar por un aminoácido de origen natural, no esencial, por ejemplo, taurina. Ejemplos no limitativos de aminoácidos de origen natural que se pueden reemplazar por aminoácidos no proteicos que incluyen los siguientes (1) un aminoácido aromático puede ser reemplazado por 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, 3-yodo-L-tirosina, triyodotirosina, L-tiroxina, fenilglicina (Phg) o nor-tirosina (norTyr); (2) Phg y norTyr y otros aminoácidos que incluyen Phe y Tyr pueden estar sustituidos, por ejemplo, por un halógeno, -CH<sub>3</sub>, -OH, -CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>, -C(O)H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CN, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -SH u otro grupo; (3) los residuos de glutamina pueden estar sustituidos con gamma-hidroxi-Glu o gamma-carboxi-Glu; (4) los residuos de tirosina pueden estar sustituidos con un aminoácido sustituido en alfa, tal como L-alfa-metilfenilalanina o por análogos tales como: 3-Amino-Tyr; Tyr(CH<sub>3</sub>); Tyr(PO<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); Tyr(SO<sub>3</sub>H); beta-ciclohexil-Ala; beta-(1-ciclopentenil)-Ala; beta-ciclopentil-Ala; beta-ciclopropil-Ala; beta-quinolil-Ala; beta-(2-tiazolil)-Ala; beta-(triazol-1-il)-Ala; beta-(2-piridil)-Ala; beta-(3-piridil)-Ala; Amino-Phe; fluoro-Phe; ciclohexil-Gly; tBu-Gly; beta-(3-benzotienil)-Ala; beta-(2-tienil)-Ala; 5-metil-Trp; y A-metil-Trp; (5) los residuos de prolina pueden estar sustituidos con homopro (ácido L-pipecólico); hidroxipro; 3,4-deshidro-Pro; 4-fluoro-Pro; o alfa-metil-Pro o análogos de aminoácidos ciclados en N(alfa)-C(alfa) con la estructura: n = 0, 1, 2, 3; y (6) los residuos de alanina pueden estar sustituidos con un aminoácido alfa-sustituido o N-metilado, tal como ácido alfa-amino isobutírico (aib), L/D-alfa-etilalanina (L/D-isovalina), L/D-metilvalina o L/D-alfa-metilleucina o un aminoácido no natural tal como beta-fluoro-Ala. La alanina también se puede sustituir con: n = 0, 1, 2, 3. Los residuos de glicina pueden estar sustituidos con ácido alfa-amino isobutírico (aib) o L/D-alfa-etilalanina (L/D-isovalina).

Otros ejemplos de aminoácidos artificiales incluyen: un análogo no natural de tirosina; un análogo no natural de glutamina; un análogo no natural de fenilalanina; un análogo no natural de serina; un análogo no natural de treonina; un aminoácido sustituido con alquilo, arilo, acilo, azido, ciano, halo, hidracina, hidrazida, hidroxilo, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, sulfonilo, seleno, éster, tioácido, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterociclo, enona, imina, aldehído, hidroxilamina, ceto o amino, o cualquier combinación de los mismos; un aminoácido con un agente de entrecruzamiento fotoactivable; un aminoácido marcado con espín; un aminoácido fluorescente; un aminoácido con un grupo funcional nuevo; un aminoácido que interacciona de forma covalente o no covalente con otra molécula; un aminoácido que se une a metal; un aminoácido que está amidado en un sitio que no se amida de forma natural; un aminoácido que contiene metal; un aminoácido radiactivo; un aminoácido fotoactivable y/o fotoisomerizable; un aminoácido que contiene una biotina o un análogo de biotina; un aminoácido glicosilado o modificado con carbohidrato; un aminoácido que contiene ceto; aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter; un aminoácido sustituido con un átomo pesado (por ejemplo, un aminoácido que contiene deuterio, tritio, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N o <sup>18</sup>O); un aminoácido escindible químicamente o fotoescindible; un aminoácido con una cadena lateral elongada; un aminoácido que contiene un grupo tóxico; un aminoácido sustituido con azúcar, por ejemplo, una serina sustituida con azúcar o similares; un aminoácido que contiene azúcar unida a carbono; un aminoácido activo redox; un ácido que contiene  $\alpha$ -hidroxi; un aminoácido que contiene aminotioácido; un aminoácido disustituido en  $\alpha,\alpha$ ; un  $\beta$ -aminoácido; un aminoácido cíclico que no sea prolina; una O-metil-L-tirosina; una L-3-(2-naftil)alanina; una 3-metilfenilalanina; una  $p$ -acetil-L-fenilalanina; una O-4-alil-L-tirosina, una 4-propil-L-tirosina; una tri-O-acetil-GlcNAc  $\beta$ -serina; una L-Dopa; una fenilalanina fluorada; una isopropil-L-fenilalanina, una  $p$ -azido-L-fenilalanina; una  $p$ -acil-L-fenilalanina, una  $p$ -benzoil-L-fenilalanina; una L-fosfoserina; una fosfonoserina; una fosfotirosina; una  $p$ -yodo-fenilalanina; una 4-fluorofenilglicina; una  $p$ -bromofenilalanina; una  $p$ -amino-L-fenilalanina; una isopropil-L-fenilalanina, L-3-(2-naftil)alanina, D-3-(2-naftil)alanina (dNal); un análogo de fenilalanina que contiene amino-, isopropil-, o O-alil-; una dopa, O-metil-L-tirosina; un aminoácido glicosilado, una  $p$ -(propargiloxi)fenilalanina; dimetil-Lisina; hidroxipro-ácido mercaptopropiónico; metil-lisina; 3-nitro-tirosina; norleucina; ácido piro-glutámico; Z (carbобензоило);  $\epsilon$ -acetil-lisina;  $\beta$ -alanina; derivado de aminobenzoilo; ácido aminobutírico (Abu); citrulina; ácido aminohexanoico; ácido aminoisobutírico (AIB); ciclohexilalanina; d-ciclohexilalanina; hidroxiprolina; nitro-arginina; nitro-fenilalanina; nitro-tirosina; norvalina; carboxilato de octahidroindol; ornitina (Orn); penicilamina (PEN); tetrahidroisoquinolina; aminoácidos protegidos en acetamidometilo y aminoácidos pegiladas. Otros ejemplos de aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos se pueden encontrar en los documentos de patente de US 20030108885, US 20030082575, US 20060019347 (párrafos 410-418) y las referencias citadas en los mismos. Los polipéptidos de la invención pueden incluir modificaciones adicionales, como las que se describen en el documento US20060019347, párrafo 589. Los péptidos agonistas de GCC ejemplares que incluyen un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, SP-368 y SP-369.

En algunas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC son péptidos cíclicos. Los péptidos agonistas de GCC cíclicos pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la macrociclación se logra frecuentemente mediante la formación de un enlace amida entre los extremos N y C-terminales del péptido, entre una cadena lateral y el extremo N o C-terminal [por ejemplo, con K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> a pH 8,5] (Samson *et al.*, Endocrinology

137: 5182-5185 (1996)), o entre dos cadenas laterales de aminoácidos, como la cisteína. Véase, por ejemplo, DeGrado, *Adv Protein Chem.*, 39:51-124 (1988). En diversas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC son biciclos [4,12; 7,15].

5 En determinadas realizaciones, uno o ambos residuos Cys que normalmente forman un enlace disulfuro en un péptido agonista de GCC, se pueden reemplazar con homocisteína, penicilamina, 3-mercaptoprolina (Kolodziej *et al.*, 1996 *Int J Pept Protein Res* 48:274);  $\beta,\beta$ -dimetilcisteína (Hunt *et al.*, 1993 *Int J Pept Protein Res* 42:249) o ácido diaminopropiónico (Smith *et al.* 1978 *J Med Chem* 2 1:117) para formar entrecruzamientos internos alternativos en las posiciones de los enlaces disulfuro normales.

10 En determinadas realizaciones, uno o más enlaces disulfuro en péptidos agonistas de GCC se pueden reemplazar por entrecruzamientos covalentes alternativos, por ejemplo, un enlace amida (-CH<sub>2</sub>CH(O)NHCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>NHCH(O)CH<sub>2</sub>-), un enlace éster, un enlace tioéster, un puente de lactama, un enlace de carbamoilo, un enlace de urea, un enlace de tiourea, un enlace de éster fosfonato, un enlace alquilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), un enlace alquenilo (-CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>-), un enlace éter (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), un enlace tioéter (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), un enlace amina (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) o un enlace tioamida (-CH<sub>2</sub>CH(S)HNHCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>NHCH(S)CH<sub>2</sub>-). Por ejemplo, Ledu *et al.* (*Proc Natl Acad. Sci.* 100:11263-78, 2003) describen métodos para preparar entrecruzamientos de lactama y amida. Ejemplos de péptidos agonistas de GCC que incluyen un puente de lactama incluyen, por ejemplo, SP-370.

20 En determinadas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC pueden tener uno o varios enlaces polipeptídicos convencionales reemplazados por un enlace alternativo. Dichos reemplazos pueden aumentar la estabilidad del polipéptido. Por ejemplo, el reemplazo del enlace polipeptídico entre un residuo amino terminal y un residuo aromático (por ejemplo, Tyr, Phe, Trp) con un enlace alternativo, puede reducir la escisión con carboxipeptidasas y puede aumentar la semivida en el tracto digestivo. Los enlaces que pueden reemplazar los enlaces polipeptídicos incluyen: un enlace retro-inverso (C(O)-NH en lugar de NH-C(O)); un enlace de amida reducida (NH-CH<sub>2</sub>); un enlace tiometileno (S-CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>-S); un enlace oxometileno (O-CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>-O); un enlace etileno (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); un enlace tioamida (C(S)-NH), un enlace trans-olefina (CH=CH); un enlace trans-olefina sustituido con flúor (CF=CH); un enlace cetometileno (C(O)-CHR o CHR-C(O) en el que R es H o CH<sub>3</sub>); y un enlace fluoro-cetometileno (C(O)-CFR o CFR-C(O) en el que R es H o F o CH<sub>3</sub>).

25 En determinadas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC se pueden modificar empleando modificaciones convencionales. Las modificaciones pueden tener lugar en el extremo amino (N-), carboxi (C-) terminal, internamente, o una combinación de cualquiera de las precedentes. En un aspecto descrito en el presente documento, puede haber más de un tipo de modificación en el polipéptido. Las modificaciones incluyen pero no se limitan a: acetilación, amidación, biotilación, cinamoilación, farnesilación, formilación, miristoilación, palmitoilación, fosforilación (Ser, Tyr o Thr), estearoilación, succinilación, sulfuración y ciclación (a través de puentes disulfuro o ciclación de amida), y modificación por Cys3 o Cys5. Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento, se pueden modificar mediante 2,4-dinitrofenilo (DNP), DNP-lisina, modificación mediante 7-amino-4-metil-cumarina (AMC), fluoresceína, NBD (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol), p-nitroanilida, rodamina B, EDANS (ácido 5-((2-aminoetil)amino)naftalen-1-sulfónico), dabculo, dabsilo, dansilo, rojo de texas, FMOC y Tamra (tetrametilrodamina). Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento también pueden conjugarse, por ejemplo, con polietilenglicol (PEG); grupos alquilo (por ejemplo, grupos alquilo lineales o ramificados C1-C20); radicales de ácidos grasos; combinaciones de PEG, grupos alquilo y radicales de ácidos grasos (véase, el documento de patente US 6.309.633; Soltero *et al.*, 2001 "Innovations in Pharmaceutical Technology" 106-110); BSA y KLH (hemocianina de lapa bocallave). La adición de PEG y otros polímeros que se pueden utilizar para modificar los polipéptidos de la invención se describen en el documento US20060 19347 sección IX.

35 Los péptidos agonistas de GCC también pueden incluir derivados de péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento. Por ejemplo, un derivado incluye formas híbridas y modificadas de los péptidos agonistas de GCC, en las que ciertos aminoácidos se han delecionado o reemplazado. Una modificación puede incluir la glicosilación. Preferiblemente, cuando la modificación es una sustitución de aminoácido, es una sustitución conservadora en una o más posiciones, se espera que sean residuos de aminoácidos no esenciales para la actividad biológica del péptido. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la cual el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales no cargadas polares (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

40 A continuación, en las tablas I-VII se encuentran los n.<sup>os</sup> de SEQ ID:1-44 y 99-107 y los ejemplos comparativos adicionales de los péptidos agonistas de GCC que pueden usarse.

65 1.2.2 Preparación de péptidos agonistas de GCC

Los péptidos agonistas de GCC pueden prepararse empleando técnicas reconocidas en la técnica tales como clonación, síntesis de péptidos o mutagénesis dirigida al sitio.

5 La síntesis de péptidos se puede realizar usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales en fase de solución o en fase sólida, en las que se produce un enlace peptídico a través de la condensación directa del grupo amino de un aminoácido con el grupo carboxilo del otro aminoácido, con la eliminación de una molécula de agua. La síntesis de enlaces peptídicos por condensación directa, tal y como se ha formulado anteriormente, requiere la supresión del carácter reactivo del grupo amino del primer aminoácido y del grupo carboxilo del segundo aminoácido. Los sustituyentes de enmascaramiento deben permitir una fácil eliminación de los mismos, sin inducir la degradación de la molécula peptídica lábil.

15 En la síntesis en fase de disolución, se puede utilizar una amplia variedad de métodos de acoplamiento y grupos protectores (véase, Gross y Meienhofer, eds., "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", vol. 1-4 (Academic Press, 1979); Bodansky y Bodansky, "The Practice of Peptide Synthesis", 2ª ed (Springer Verlag, 1994)). Además, es posible la purificación intermedia y la escala lineal. Los expertos normales en la técnica apreciarán que la síntesis en solución requiere la consideración de grupos protectores de la cadena principal y de cadenas laterales y el método de activación. Además, es necesaria una selección cuidadosa del segmento para minimizar la racemización durante la condensación del segmento. Las consideraciones de la solubilidad son también un factor. La síntesis de péptidos en fase sólida usa un polímero insoluble como soporte durante la síntesis orgánica. La cadena peptídica sujeta con el polímero, permite el uso de una simple etapa de lavado y de filtración, en lugar de purificaciones laboriosas en etapas intermedias. La síntesis de péptidos en fase sólida se puede realizar generalmente de acuerdo con el método de Merrifield *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85:2149, que implica ensamblar una cadena peptídica lineal sobre un soporte de resina usando aminoácidos protegidos. La síntesis de péptidos en fase sólida utiliza una estrategia ya sea de Boc o Fmoc, que son bien conocidas en la técnica.

25 Los expertos normales en la técnica reconocerán que, en la síntesis en fase sólida, las reacciones de desprotección y acoplamiento deben completarse y los grupos de bloqueo de la cadena lateral deben ser estables a lo largo de la síntesis. Además, la síntesis en fase sólida es generalmente la más apropiada cuando los péptidos se deben preparar a pequeña escala.

35 La acetilación del extremo N-terminal se puede conseguir haciendo reaccionar el péptido final con anhídrido acético, antes de la escisión desde la resina. La C-amidación se lleva a cabo usando una resina apropiada tal como una resina de metilbenzimidilamina usando la tecnología Boc.

40 Alternativamente, los péptidos agonistas de GCC se producen por técnicas de clonación modernas. Por ejemplo, los péptidos agonistas de GCC se producen ya sea en bacterias, incluyendo, sin limitación, *E. coli*, o en otros sistemas existentes para la producción de polipéptidos o proteínas (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, sistemas de expresión de baculovirus usando células Sf9 de *Drosophila*, levadura o sistemas de expresión de hongos filamentosos, sistemas de expresión de células de mamífero), o se pueden sintetizar químicamente. Si el péptido agonista de GCC o un péptido variante se va a producir en bacterias, por ejemplo, *E. coli*, la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido también puede codificar una secuencia líder que permite la secreción del polipéptido maduro a partir de la célula. Así, la secuencia que codifica el polipéptido puede incluir la presecuencia y la prosecuencia, por ejemplo, de un polipéptido ST bacteriano de origen natural. El polipéptido maduro secretado, se puede purificar a partir del medio de cultivo.

50 La secuencia que codifica para un péptido agonista de GCC descrita en el presente documento se puede insertar en un vector capaz de suministrar y mantener la molécula de ácido nucleico en una célula bacteriana. La molécula de ADN puede insertarse en un vector de replicación autónoma (los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, pGEM3Z y pcDNA3, y derivados de los mismos). El ácido nucleico del vector puede ser ADN bacteriano o de bacteriófago, tal como el bacteriófago lambda o M13 y derivados de los mismos. La construcción de un vector que contiene un ácido nucleico descrito en el presente documento, se puede seguir mediante la transformación de una célula hospedadora tal como una bacteria. Los hospedadores bacterianos adecuados incluyen, pero no están limitados a, *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Salmonella*. La estructura artificial genética también incluye, además de la molécula de ácido nucleico codificante, elementos que permiten la expresión, tales como secuencias promotoras y reguladoras. Los vectores de expresión pueden contener secuencias de control de la transcripción que controlan la iniciación de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras.

60 Una variedad de secuencias de control de la transcripción son bien conocidas en la técnica. El vector de expresión también puede incluir una secuencia reguladora de la traducción (por ejemplo, una secuencia 5' no traducida, una secuencia 3' no traducida, o un sitio interno de entrada al ribosoma). El vector puede ser capaz de una replicación autónoma o puede estar integrado en un ADN hospedador para asegurar la estabilidad durante la producción del polipéptido.

65 La secuencia que codifica para la proteína que incluye un péptido agonista de GCC descrito en el presente

documento, también se puede fusionar con un ácido nucleico que codifica un marcador con afinidad hacia el polipéptido, por ejemplo, glutatión-S-transferasa (GST), proteína que se une a la maltosa E, proteína A, marcador FLAG, hexahistidina, marcador myc o marcador HA de la gripe, con el fin de facilitar la purificación. La fusión del marcador de afinidad o informador une el marco de lectura del polipéptido de interés con el marco de lectura del gen que codifica el marcador de afinidad, de modo que se genera una fusión de traducción. La expresión del gen de fusión da como resultado la traducción de un único polipéptido que incluye tanto el polipéptido de interés como el marcador de afinidad. En algunos casos en los que se utilizan marcadores de afinidad, la secuencia de ADN que codifica un sitio de reconocimiento de la proteasa se fusionará entre los marcos de lectura del marcador de afinidad y del polipéptido de interés.

Los constructos genéticos y los métodos adecuados para la producción de formas inmaduras y maduras de péptidos agonistas de GCC y variantes descritas en el presente documento, en sistemas de expresión de proteínas distintos de las bacterias, que son bien conocidos por los expertos en la técnica, también se pueden utilizar para producir polipéptidos en un sistema biológico.

Los péptidos dados a conocer en el presente documento se pueden modificar por la fijación de una segunda molécula que confiere una propiedad deseada al péptido, tal como un aumento de la semivida en el cuerpo, por ejemplo, la pegilación. Tales modificaciones también están dentro del alcance del término "variante", tal y como se usa en el presente documento.

Tabla I. Péptidos de GCRA (SP-304 y derivados)

Nombre	Posición de los enlaces de disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
SP-304	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	1
SP-326	C3:C11, C6:C14	Asp <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Glu <sup>4</sup> -Leu <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Val <sup>7</sup> -Asn <sup>8</sup> -Val <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Cys <sup>11</sup> -Thr <sup>12</sup> -Gly <sup>13</sup> -Cys <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup>	2
SP-327	C2:C10, C5:C13	Asp <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Glu <sup>4</sup> -Leu <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Val <sup>7</sup> -Asn <sup>8</sup> -Val <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Cys <sup>11</sup> -Thr <sup>12</sup> -Gly <sup>13</sup> -Cys <sup>14</sup>	3
SP-328	C2:C10, C5:C13	Glu <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Leu <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Leu <sup>14</sup>	4
SP-329	C2:C10, C5:C13	Glu <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Leu <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup>	5
SP-330	C1:C9, C4:C12	Cys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Leu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Val <sup>5</sup> -Asn <sup>6</sup> -Val <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Cys <sup>9</sup> -Thr <sup>10</sup> -Gly <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Leu <sup>13</sup>	6
SP-331	C1:C9, C4:C12	Cys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Leu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Val <sup>5</sup> -Asn <sup>6</sup> -Val <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Cys <sup>9</sup> -Thr <sup>10</sup> -Gly <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup>	7
SP-332	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	8
SP-333	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	9
SP-334	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	10
SP-335	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -dGlu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	11
SP-336	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Leu <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Val <sup>7</sup> -Asn <sup>8</sup> -Val <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Cys <sup>11</sup> -Thr <sup>12</sup> -Gly <sup>13</sup> -Cys <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	12
SP-337	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -dLeu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	13
SP-338	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	14
SP-342	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	15
SP-343	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	16
SP-344	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	17
SP-347	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	18
SP-348	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	19
SP-350	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	20
SP-352	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	21
SP-358	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -dGlu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	22
SP-359	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -dGlu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	23
SP-360	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -dGlu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	24

SP-361	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	25
SP-362	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	26
SP-368	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dNal <sup>16</sup>	27
SP-369	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -AIB <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -AIB <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	28
SP-370	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Asp[Lactam] <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Om <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	29
SP-371	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	30
SP-372	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	31
N1	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	32
N2	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	33
N3	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	34
N4	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	35
N5	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup>	36
N6	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu <sup>16</sup> -PEG3	37
N7	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	38
N8	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup> -PEG3	39
N9	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	40
N10	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup> -PEG3	41
N11	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dSer <sup>16</sup> -PEG3	42
N12	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dSer <sup>16</sup>	43
N13	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dSer <sup>16</sup> -PEG3	44
Fórmula I	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Xaa <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Xaa <sup>16</sup>	45
Fórmula II	C4:C12, C7:C15	Xaa <sup>n1</sup> -Cys <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Xaa <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Xaa <sup>n2</sup>	46
Fórmula III	4:12, 7:15	Xaa <sup>n1</sup> -Maa <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Maa <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Maa <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Maa <sup>15</sup> -Xaa <sup>n2</sup>	47

Fórmula IV	4:12,7:15	Xaa <sub>n1</sub> -Maa <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Maa <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Xaa <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Maa <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Maa <sup>15</sup> -Xaa <sub>n2</sub>	48
Fórmula V	C4:C12,C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Xaa <sup>16</sup>	49
Fórmula VI	C4:C12,C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -X <sup>3B</sup> -Asn <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -d-Xaa	50
Fórmula VII	C4:C12,C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dGlu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -d-Xaa <sup>16</sup>	51
Fórmula VIII	C4:C12,C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -d-Xaa <sup>16</sup>	52
Fórmula VIII	C4:C12,C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dAsp <sup>2</sup> -dGlu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Tyr <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -d-Xaa <sup>16</sup>	53
Fórmula IX	C4:C12,C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -dGlu <sup>2</sup> -dGlu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Tyr <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -d-Xaa	54

Tabla II. Linaclotida y derivados

Nombre	Posición de los enlaces de disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
SP-339 (linaclotida)	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Tyr <sup>14</sup>	55
SP-340	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup>	56
SP-349	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Tyr <sup>14</sup> -PEG3	57
SP-353	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	58
SP-354	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Phe <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	59
SP-355	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -dTyr <sup>14</sup>	60
SP-357	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Tyr <sup>14</sup>	61
SP-374	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	62
SP-375	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTyr <sup>16</sup>	63
SP-376	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	64
SP-377	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTyr <sup>16</sup>	65
SP-378	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTyr <sup>16</sup>	66
SP-379	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	67
SP-380	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTyr <sup>16</sup>	68
SP-381	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Phe <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTyr <sup>16</sup>	69
SP-382	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Phe <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	70
SP-383	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Phe <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTyr <sup>16</sup>	71
SP384	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Tyr <sup>14</sup> -PEG3	72
N14	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -PEG3	73
N15	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup>	74
N16	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -PEG3	75
N17	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup> , PEG3	76
N18	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	77
N19	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup> -PEG3	78

N20	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Phe <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup> -PEG3	79
N21	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Phe <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	80
N22	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Phe <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup> -PEG3	81
N23	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup> -PEG3	82
N24	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	83
N25	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup> -PEG3	84
N26	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Ser <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Tyr <sup>14</sup>	85
N27	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Tyr <sup>14</sup>	86
N28	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Ser <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Tyr <sup>14</sup>	87
N29	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Phe <sup>4</sup> -Cys <sup>5</sup> -Cys <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup>	88
N30	1:6, 2:10, 5:13	Pen <sup>1</sup> -Pen <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Pen <sup>5</sup> -Pen <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Pen <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Tyr <sup>14</sup>	89
N31	1:6, 2:10, 5:13	Pen <sup>1</sup> -Pen <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Tyr <sup>4</sup> -Pen <sup>5</sup> -Pen <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Pen <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Pen <sup>13</sup>	90
Fórmula X	C9:C14, C10:C18, C13:21	Xaa <sup>1</sup> -Xaa <sup>2</sup> -Xaa <sup>3</sup> -Xaa <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Tyr <sup>8</sup> -Cys <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Tyr <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Cys <sup>14</sup> -Xaa <sup>15</sup> -Xaa <sup>16</sup> -Xaa <sup>17</sup> -Xaa <sup>18</sup> -Xaa <sup>19</sup> -Xaa <sup>20</sup> -Cys <sup>21</sup> -Xaa <sup>22</sup>	91
Fórmula XI	C9:C14, C10:C18, C13:21	Tyr <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Cys <sup>14</sup> -Xaa <sup>15</sup> -Xaa <sup>16</sup> -Xaa <sup>17</sup> -Cys <sup>18</sup> -Xaa <sup>19</sup> -Xaa <sup>20</sup> -Cys <sup>21</sup> -Xaa <sup>22</sup>	92
Fórmula XII	C3:C8, C4:C12, C7:15	Xaa <sup>1</sup> -Xaa <sup>2</sup> -Xaa <sup>3</sup> -Xaa <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Phe <sup>8</sup> -Cys <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Xaa <sup>16</sup>	93
Fórmula XIII	3:8, 4:12, C:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Pen <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Phe <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Pen <sup>8</sup> -Xaa <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Xaa <sup>16</sup>	94
Fórmula XIV	3:8, 4:12, 7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Maa <sup>3</sup> -Maa <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Maa <sup>7</sup> -Maa <sup>8</sup> -Xaa <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Maa <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Maa <sup>15</sup> -Xaa <sup>16</sup>	95
Fórmula XV	1:6,2:10,5:13	Maa <sup>1</sup> -Maa <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Xaa <sup>4</sup> -Maa <sup>5</sup> -Maa <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Maa <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Maa <sup>13</sup> -Tyr <sup>14</sup>	96
Fórmula XVI	1:6, 2:10, 5:13	Maa <sup>1</sup> -Maa <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Xaa <sup>4</sup> -Maa <sup>5</sup> -Maa <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Pro <sup>8</sup> -Ala <sup>9</sup> -Maa <sup>10</sup> -Thr <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Maa <sup>13</sup> -Maa <sup>14</sup>	97
Fórmula XVII	1:6,2:10,5:13	Xaa <sup>1</sup> -Maa <sup>2</sup> -Maa <sup>3</sup> -Xaa <sup>4</sup> -Maa <sup>5</sup> -Maa <sup>6</sup> -Xaa <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Xaa <sup>9</sup> -Maa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Xaa <sup>12</sup> -Maa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup>	98

Tabla III. Péptidos de GCRA

Nombre	Posición de los enlaces de disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
SP-363	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu-AMIDE <sup>16</sup>	99
SP-364	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dSer <sup>16</sup>	100
SP-365	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dSer-AMIDE <sup>16</sup>	101
SP-366	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTYr <sup>16</sup>	102
SP-367	C4:C12, C7:C15	dAsn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTYr-AMIDE <sup>16</sup>	103
SP-373	C4:C12, C7:C15	<sup>14</sup> Glu <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dLeu-AMIDE <sup>16</sup>	104
SP-304 diPEG	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup> -PEG3	105
SP-304 N-PEG	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	106
SP-304 C-PEG	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup> -PEG3	107

Tabla IV. Análogos de SP-304, uroguanilina y análogos de uroguanilina

Nombre	Posición de los enlaces de disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
Fórmula XVIII	C4:C12, C7:C15	Xaa <sup>1</sup> -Xaa <sup>2</sup> -Xaa <sup>3</sup> -Maa <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Maa <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Xaa <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Maa <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Maa <sup>15</sup> -Xaa <sup>16</sup>	108
Uroguanilina	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	109
N32	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	110
N33	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	111
N34	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	112
N35	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	113
N36	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	114
N37	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	115
N38	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	116
N39	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	117
N40	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	118
N41	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	119
N42	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	120
N43	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	121
N44	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	122
N45	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	123
N46	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	124
N47	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	125
N48	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	126
N49	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	127
N50	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	128
N51	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	129

N52	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>16</sup> Asp <sup>16</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	130
N53	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>16</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	131
N54	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>16</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	132
N55	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>16</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	133
N56	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	134
N57	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	135
N58	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	136
N59	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	137
N60	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	138
N61	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	139
N62	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	140
N63	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	141
N65	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	142
N66	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	143
N67	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	144
N68	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	145
N69	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	146
N70	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	147
N71	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	148
N72	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	149
N73	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	150
N74	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	151

N75	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	152
N76	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	153
N77	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	154
N78	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	155
N79	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	156
N80	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	157
N81	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	158
N82	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	159
N83	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	160
N84	C4:C12, C7:C15	Glu <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	161
N85	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	162
N86	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	163
N87	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	164
N88	C4:C12, C7:C15	Asp <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	165
N 89	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	166
N90	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	167
N91	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	168
N92	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	169
N93	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	170
N94	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	171
N95	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	172
N96	C4:C12, C7:C15	Lys <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	173

Tabla V. Guanilina y análogos

Nombre	Posición de los enlaces de disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
Fórmula XIX	4:12,7:15	Xaa <sup>1</sup> -Xaa <sup>2</sup> -Xaa <sup>3</sup> -Maa <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Maa <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Xaa <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Maa <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Maa <sup>15</sup>	174
Guanilina	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Phe <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	175
N97	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	176
N98	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	177
N99	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	178
N100	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	179
N101	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	180
N102	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	181
N103	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	182
N104	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	183
N105	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	184
N106	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	185
N107	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	186
N108	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	187
N109	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	188
N110	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	189
N111	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	190
N112	C4:C12, C7:C15	Ser <sup>1</sup> -His <sup>2</sup> -Thr <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	191
N113	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	192
N114	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	193
N115	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	194
N116	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	195
N117	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	196
N118	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	197
N119	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	198
N120	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	199
N121	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	200
N122	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	201
N123	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	202
N124	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	203
N125	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	204
N126	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	205
N127	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Val <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	206
N128	C4:C12, C7:C15	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ala <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Ala <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Ala <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup>	207

Tabla VI. Linfoguaniina y análogos

Nombre	Posición de los enlaces de disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
Fórmula XX	4:12,7:15	Xaa <sup>1</sup> -Xaa <sup>2</sup> -Xaa <sup>3</sup> -Maa <sup>4</sup> -Xaa <sup>5</sup> -Xaa <sup>6</sup> -Maa <sup>7</sup> -Xaa <sup>8</sup> -Xaa <sup>9</sup> -Xaa <sup>10</sup> -Xaa <sup>11</sup> -Maa <sup>12</sup> -Xaa <sup>13</sup> -Xaa <sup>14</sup> -Xaa <sup>15</sup>	208
Linfoguaniina	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	209
N129	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	210
N130	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	211
N131	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	212
N132	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	213
N133	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Glu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	214
N134	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Glu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	215
N135	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Glu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	216
N136	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Glu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	217
N137	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	218
N138	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	219
N139	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	220
N140	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	221
N141	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	222
N142	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	223
N143	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	224
N144	C4:C12	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Tyr <sup>15</sup>	225
N145	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	226
N146	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	227
N147	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	228
N148	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	229
N149	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Glu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	230
N150	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Glu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	231
N151	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Glu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	232
N152	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Glu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	233
N153	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	234
N154	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	235
N155	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	236

N156	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Tyr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	237
N157	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	238
N158	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	239
N159	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	240
N160	C4:C12, C7:C15	Gln <sup>1</sup> -Glu <sup>2</sup> -Asp <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Ile <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Ile <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Met <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Ser <sup>16</sup>	241

Tabla VII. Péptido ST y análogos

Nombre	Posición de los enlaces de disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
Péptido ST	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Ser <sup>2</sup> -Ser <sup>3</sup> -Asn <sup>4</sup> -Ser <sup>5</sup> -Ser <sup>6</sup> -Asn <sup>7</sup> -Tyr <sup>8</sup> -Cys <sup>9</sup> -Cys <sup>10</sup> -Glu <sup>11</sup> -Lys <sup>12</sup> -Cys <sup>13</sup> -Cys <sup>14</sup> -Asn <sup>15</sup> -Pro <sup>16</sup> -Ala <sup>17</sup> -Cys <sup>18</sup> -Thr <sup>19</sup> -Gly <sup>20</sup> -Cys <sup>21</sup> -Tyr <sup>22</sup>	242
N161	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup> -PEG3	243
N162	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	244
N163	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup> -PEG3	245
N164	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	246
N165	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTyr <sup>16</sup>	247
N166	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -dTyr <sup>16</sup>	248
N167	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Cys <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Thr <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Tyr <sup>16</sup>	249

### 1.3. Métodos de uso

La invención proporciona una formulación de agonista de GCC para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos gastrointestinales y aumento de la motilidad gastrointestinal en un sujeto que la necesita mediante la administración de una cantidad eficaz de una formulación de agonista de GCC al sujeto. Los ejemplos no limitativos de trastornos gastrointestinales que pueden tratarse o prevenirse según los métodos de la invención incluyen síndrome del intestino irritable (IBS, dispepsia no ulcerosa, pseudoobstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudoobstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), íleo (por ejemplo, íleo postoperatorio), gastroparesia, pirosis (alta acidez en el tracto GI), estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado al uso de medicaciones tales como opioides, fármacos para la osteoartritis, fármacos para la osteoporosis); estreñimiento post-operatorio, estreñimiento asociado a trastornos neuropáticos, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cáncer gástrico y cáncer de colon.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un péptido agonista de GCC es para su administración a un sujeto.

Los péptidos agonistas de GCC pueden estar en una composición farmacéutica en forma de dosis unitaria, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La expresión "forma de dosis unitaria" se refiere a una entidad única de administración del fármaco, por ejemplo, un comprimido, una cápsula, una solución o una formulación para inhalación. La cantidad de péptido presente debe ser suficiente para tener un efecto terapéutico positivo cuando se administra a un paciente (típicamente, entre 10 µg y 3 g). Lo que constituye un "efecto terapéutico positivo" dependerá del estado particular a tratar e incluirá cualquier mejora significativa en un estado, reconocido fácilmente por un experto en la técnica.

Las formulaciones de agonista de GCC son para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades y trastornos que se benefician del direccionamiento selectivo del agonista de GCC a una región del tracto gastrointestinal. En una realización, la formulación de agonista de GCC dirige la administración del agonista de GCC al duodeno o yeyuno. Según esta realización, la formulación de agonista de GCC es particularmente útil para el tratamiento o la prevención de uno o más de los siguientes: síndrome del intestino irritable (preferiblemente estreñimiento predominante), dispepsia no ulcerosa, pseudoobstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudoobstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico, estreñimiento idiopático crónico, gastroparesia, pirosis, cáncer gástrico e infección por *H. pylori*. En una realización, la formulación de agonista de GCC para la administración dirigida al duodeno o yeyuno comprende un polímero dependiente del pH con un pH umbral de entre 4,5 y 6. En otra realización, la formulación de agonista de GCC dirige la administración del agonista de GCC al íleon o colon. Según esta realización, la formulación de agonista de GCC es particularmente útil para el tratamiento o la prevención de uno o más de los siguientes: ileítis (ileítis posoperatoria), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, ileítis terminal y cáncer de colon. En una realización, la formulación de agonista de GCC para la administración dirigida al íleon o colon comprende un polímero dependiente del pH con un pH umbral de entre 6,5 y 7,5.

La dosis específica del agonista de GCC que va a administrarse en las formulaciones de la invención dependerá de la naturaleza de la enfermedad o trastorno que va a tratarse o prevenirse así como de su gravedad. Otros factores usados rutinariamente en la determinación de la dosificación para un sujeto particular incluyen el peso corporal del sujeto, la salud general, la dieta y la historia natural de enfermedad. La vía de administración y el programa de administración también se considerarán. En determinadas realizaciones, una dosis eficaz de un agonista de GCC será normalmente de entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 3 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente de entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 1 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal. En otras realizaciones, la dosificación de un agonista de GCC será eficaz para inducir actividad antiinflamatoria en el tejido diana, especialmente el intestino grueso (por ejemplo, el íleon terminal y colon). Según esta realización, la dosificación eficaz del agonista de GCC será de desde 0,01 mg hasta 10 mg por kilogramo de peso corporal. En una realización preferida, la dosificación eficaz es de 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg de peso corporal. Se realizarán ajustes en la dosificación usando métodos que son de rutina en la técnica y se basarán en la composición particular que está usándose y consideraciones clínicas.

Los agonistas de GCC se administran preferiblemente por vía oral. Las formas de dosificación incluyen disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos y cápsulas.

La dosis diaria total puede administrarse al paciente en una única dosis, o en múltiples subdosis. Normalmente, las subdosis pueden administrarse de dos a seis veces al día, preferiblemente de dos a cuatro veces al día, e incluso más preferiblemente de dos a tres veces al día.

Los agonistas de GCC pueden administrarse o bien como el único agente activo o bien en combinación con uno o más agentes activos adicionales. En todos los casos, los agentes activos adicionales deben administrarse a una dosificación que es eficaz terapéuticamente usando la técnica existente como guía. Los agonistas de GCC pueden administrarse en una única composición o secuencialmente con el uno o más agentes activos adicionales. En una realización, el agonista de GCC es para su administración en combinación con uno o más inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de GMPc tales como suldinac sulfona, zaprinast, motapizona, vardenafilo o sildenafil.

En otra realización, el agonista de GCC es para su administración en combinación con uno o más agentes quimioterápicos. En otra realización, el agonista de GCC es para su administración en combinación con uno o más fármacos antiinflamatorios tales como esteroides o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como aspirina.

5 La terapia de combinación puede lograrse mediante la administración de dos o más agentes, por ejemplo, un péptido agonista de GCC descrito en el presente documento y otro compuesto, cada uno de los cuales se formula y se administra por separado, o mediante la administración de dos o más agentes en una sola formulación. Otras combinaciones también están incluidas en la terapia de combinación. Por ejemplo, dos agentes pueden formularse  
10 juntos y administrarse junto con una formulación separada que contiene un tercer agente. Mientras que los dos o más agentes en la terapia de combinación pueden administrarse simultáneamente, no es necesario. Por ejemplo, la administración de un primer agente (o combinación de agentes) puede preceder a la administración de un segundo agente (o combinación de agentes) en minutos, horas, días o semanas. Así, los dos o más agentes pueden administrarse con minutos de diferencia entre sí, o con 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 ó 24 horas de diferencia entre sí, o  
15 con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 días de diferencia entre sí, o con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 semanas de diferencia entre sí. En algunos casos, son posibles intervalos incluso más largos. Mientras que en muchos casos es deseable que los dos o más agentes utilizados en una terapia de combinación estén presentes en el cuerpo del paciente al mismo tiempo, esto no tiene que ser así.

20 Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento se pueden combinar con inhibidores de la fosfodiesterasa, por ejemplo, sulfona sulindaco, zaprinast, sildenafilo, vardenafilo o tadalafilo para mejorar aún más los niveles de GMPc en los tejidos u órganos diana.

La terapia de combinación también puede incluir dos o más administraciones de uno o varios de los agentes usados en la combinación. Por ejemplo, si el agente X y el agente Y se utilizan en una combinación, uno se podría administrar secuencialmente del otro, en cualquier combinación una o varias veces, por ejemplo, en el orden X-Y-X,  
25 X-X-Y, Y-X-Y, Y-Y-X, X-X-Y-Y, etc.

### 1.3.1 Agentes a modo de ejemplo para terapia de combinación

30 La formulación de agonista de GCC puede ser para su administración sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno gastrointestinal. En algunas realizaciones, la formulación de agonista de GCC comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales. En otras realizaciones, el agonista de GCC se formula por separado del  
35 uno o más agentes terapéuticos adicionales. Según esta realización, el agonista de GCC se administra o bien simultáneamente, secuencialmente o bien en un momento diferente que el uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una realización, la formulación de agonista de GCC se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de fosfodiesterasa, nucleótidos cíclicos (tales como GMPc y cAMP), un laxante (tal como SENNA o METAMUCIL), un ablandador de las deposiciones, una terapia contra el factor de necrosis tumoral alfa para IBD (tal como REMICADE, ENBREL o HUMIRA) y fármacos antiinflamatorios (tales como inhibidores de COX-2, sulfasalazina, derivados de 5-ASA y AINE). En determinadas realizaciones, la formulación de agonista de GCC se administra en combinación con una dosis eficaz de un inhibidor de fosfodiesterasa específica de GMPc (GMPc-PDE) o bien simultáneamente o bien  
40 secuencialmente con dicho agonista de GCC. Los inhibidores de GMPc-PDE incluyen, por ejemplo, suldinac sulfona, zaprinast, motapizona, vardenifilo y sildenafilo. En otra realización, la formulación de agonista de GCC se administra en combinación con inhibidores de transportadores de nucleótidos cíclicos. Se proporcionan en las siguientes secciones ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con las formulaciones de agonista de GCC de la invención.

#### 1.3.1.1 Agentes para tratar cánceres gastrointestinales

Las formulaciones de agonista de GCC descritas en el presente documento pueden usarse en combinación con uno o más agentes antitumorales incluyendo pero sin limitarse a agentes alquilantes, epipodofilotoxinas, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides de la vinca, antibióticos de antraciclina, agentes de mostaza nitrogenada, y similares. Los  
55 agentes antitumorales particulares incluyen tamoxifeno, taxol, etopósido y 5-fluorouracilo. En una realización, las formulaciones de agonista de GCC se usan en combinación con un agente antiviral o un anticuerpo monoclonal.

Los ejemplos no limitativos de agentes antitumorales que pueden usarse en combinación con las formulaciones de agonista de GCC de la invención para el tratamiento de cáncer de colon incluyen agentes antiproliferativos, agentes para la modificación o reparación del ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, reguladores de la transcripción de ADN/ARN, inhibidores del procesamiento del ARN, agentes que afectan a la expresión, síntesis y estabilidad de proteínas, agentes que afectan a la localización de proteínas o su capacidad para ejercer su acción fisiológica, agentes que interfieren con interacciones proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, agentes que actúan mediante interferencia de ARN, moléculas de unión a receptores de cualquier naturaleza química (incluyendo moléculas pequeñas y anticuerpos), toxinas dirigidas, activadores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, reguladores génicos, inhibidores de HSP-90, moléculas que interfieren con microtúbulos u otros componentes del citoesqueleto o la

adhesión y motilidad celulares, agentes para fototerapia, y adyuvantes de terapia.

Los agentes antiproliferativos representativos incluyen N-acetil-D-esfingosina (C.sub.2 ceramida), apigenina, cloruro de berberina, sal de disodio del ácido diclorometilendifosfónico, loe-emodina, emodina, HA 14-1, N-hexanoil-D-esfingosina (C.sub.6 ceramida), 7b-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, hiperforina, partenolida y rapamicina.

Los agentes representativos para la modificación y reparación del ADN incluyen afidicolina, sulfato de bleomicina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida monohidratada, ciclofosfamida monohidratada ISOPAC.RTM., dicloruro de cis-diaminoplatino (II) (cisplatino), esculetina, melfalán, clorhidrato de metoxiamina, mitomicina C, diclorhidrato de mitoxantrona, oxaliplatino y estreptozocina.

Los inhibidores de la síntesis de ADN representativos incluyen (.+-.).ametopterin (metotrexato), 1,4-dióxido de 3-amino-1,2,4-benzotriazina, aminopterina, b-D-arabinofuranósido de citosina (Ara-C), clorhidrato de b-D-arabinofuranósido de citosina (Ara-C), 2-fluoroadenina-9-b-D-arabinofuranósido (des-fosfato de fludarabina; F-ara-A), 5-fluoro-5'-deoxiuridina, 5-fluorouracilo, ganciclovir, hidroxiurea, 6-mercaptopurina y 6-tioguanina.

Los reguladores de la transcripción de ADN/ARN representativos incluyen actinomicina D, clorhidrato de daunorubicina, 1-b-D-ribofuranósido de 5,6-diclorobencimidazol, clorhidrato de doxorubicina, homoharringtonina y clorhidrato de idarubicina.

Los activadores e inhibidores enzimáticos representativos incluyen forskolina, DL-aminoglucetimidida, apicidina, inhibidor de Bowman-Birk, buteína, (S)-(+)-camptotecina, curcumina, (-)-deguelina, (-)-depudecina, hclato de doxiciclina, etopósido, formestano, sal de sodio de fostriecina, hispidina, ácido 2-imino-1-imidazolidinacético (ciclocreatina), oxamflatina, ácido 4-fenilbutírico, roscovitina, valproato de sodio, tricostatina A, tirfostina AG 34, tirfostina AG 879, fragmento inhibidor de tripsina urinaria, ácido valproico (ácido 2-propilpentanoico) y XK469.

Los reguladores génicos representativos incluyen 5-aza-2'-deoxicitidina, 5-azacitidina, colecalciferol (vitamina D3), ciglitizona, acetato de ciproterona, 15-desoxi-D.sup.12,14-prostaglandina J.sub.2, epitestosterona, flutamida, sal de amonio de ácido glicirizico (glicirizina), 4-hidroxitamoxifeno, mifepristona, clorhidrato de procainamida, clorhidrato de raloxifeno, todo trans-retinal (aldehído de vitamina A), ácido retinoico (ácido de vitamina A), ácido 9-cis-retinoico, ácido 13-cis-retinoico, p-hidroxianilida de ácido retinoico, retinol (vitamina A), tamoxifeno, sal de citrato de tamoxifeno, ácido tetradeciltioacético y troglitazona.

Los inhibidores de HSP-90 representativos incluyen 17-(alilamino)-17-desmetoxigeldanamicina y geldanamicina.

Los inhibidores de microtúbulos representativos incluyen colchicinas, dolastatina 15, nocodazol, taxanos y en particular paclitaxel, podofilotoxina, rizoxina, sal de sulfato de vinblastina, sal de sulfato de vincristina y sal de sulfato de vindesina y sal de ditartrato de vinorelbina (Navelbine).

Los agentes representativos para realizar fototerapia incluyen anillos de porfirina fotoactivos, hipericina, 5-metoxipsoralen, 8-metoxipsoralen, psoralen y ácido ursodesoxicólico.

Los agentes representativos usados como adyuvantes de terapia incluyen amifostina, 4-amino-1,8-naftalimida, brefeldina A, cimetidina, sal de disodio de fosfomicina, sal de acetato de leuprolida (leuprorelina), sal de acetato de hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH), lectina, clorhidrato de papaverina, pifitrina-a, bromhidrato de (-)-escopolamina y tapsigargina.

Los agentes también pueden ser agentes anti-VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), tal como se conocen en la técnica. Varios anticuerpos y moléculas pequeñas están actualmente en ensayos clínicos o se han aprobado que funcionan inhibiendo VEGF, tales como Avastin (Bevacizumab), SU5416, SU11248 y BAY 43-9006. Los agentes también pueden dirigirse contra receptores de factores de crecimiento tales como los de la familia de EGF/Erb-B tal como el receptor de EGF (Iressa o Gefitinib, y Tarceva o Erlotinib), Erb-B2, receptor (Herceptin o Trastuzumab), otros receptores (tales como Rituximab o Rituxan/MabThera), tirosina cinasas, tirosina cinasas no receptoras, serina/treonina cinasas celulares (incluyendo MAP cinasas), y otras proteínas diversas cuya desregulación contribuye a la oncogénesis (tales como proteínas de la familia Ras/pequeñas y proteínas heterotriméricas G/grandes). Varios anticuerpos y moléculas pequeñas que se dirigen a esas moléculas están actualmente en diversas fases de desarrollo (incluyendo aprobados para el tratamiento o en ensayos clínicos).

En una realización preferida, la invención proporciona un método para tratar cáncer de colon en un sujeto que lo necesita administrando al sujeto una formulación de agonista de GCC en combinación con uno o más agentes antitumorales seleccionados del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, tamoxifeno, vinorelbina, gemcitabina, cisplatino, etopósido, topotecán, irinotecán, anastrozol, rituximab, trastuzumab, fludarabina, ciclofosfamida, gentuzumab, carboplatino, interferones y doxorubicina. En una realización particular el agente antitumoral es paclitaxel. En una realización adicional, el método comprende además un agente antitumoral seleccionado del grupo que consiste en 5-FU, doxorubicina, vinorelbina, citoxano y cisplatino.

## 1.3.1.2 Agentes que tratan la enfermedad de Crohn

En una realización, una formulación de agonista de GCC es para su administración como parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de enfermedad de Crohn. Los ejemplos no limitativos del uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen sulfasalazina y otros fármacos que contienen mesalamina, generalmente conocidos como agentes de 5-ASA, tales como Asacol, Dipentum o Pentasa, o infliximab (REMICADE). En determinadas realizaciones, el uno o más agentes adicionales son un corticosteroide o un agente inmunosupresor tal como 6-mercaptopurina o azatioprina. En otra realización, el uno o más agentes adicionales son un agente antidiarreico tal como difenoxilato, loperamida o codeína.

## 1.3.1.3 Agentes que tratan la colitis ulcerosa

En una realización, una formulación de agonista de GCC es para su administración como parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de colitis ulcerosa. Los agentes que se usan para tratar la colitis ulcerosa se solapan con los usados para tratar la enfermedad de Crohn. Los ejemplos no limitativos del uno o más agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse en combinación con una formulación de agonista de GCC de la invención incluyen aminosalicilatos (fármacos que contienen ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)) tales como sulfasalazina, olsalazina, mesalamina y balsalazida. Otros agentes terapéuticos que pueden usarse incluyen corticosteroides, tales como prednisona e hidrocortisona, inmunomoduladores, tales como azatioprina, 6-mercaptopurina (6-MP), citocinas, interleucinas y linfoquinas, y agentes anti-TNF-alfa, incluyendo las tiazolidindionas o glitazonas tales como rosiglitazona y pioglitazona. En una realización, el uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye tanto ciclosporina A como 6-MP o azatioprina para el tratamiento de colitis ulcerosa activa, grave.

## 1.3.1.4 Agentes que tratan el estreñimiento/síndrome del intestino irritable

En una realización, una formulación de agonista de GCC es para su administración como parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de estreñimiento, tal como el asociado con síndrome del intestino irritable. Los ejemplos no limitativos del uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen laxantes tales como SENNA, MIRALAX, LACTULOSE, PEG o policarbofilo de calcio), ablandadores de las deposiciones (tales como aceite mineral o COLACE), agentes de carga (tales como METAMUCIL o salvado), agentes tales como ZELNORM (también denominado tegaserod) y medicamentos anticolinérgicos tales como BENTILO y LEVSIN.

## 1.3.1.5 Agentes para el tratamiento de íleo posoperatorio

En una realización, una formulación de agonista de GCC es para su administración como parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de íleo posoperatorio. Los ejemplos no limitativos del uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen ENTEREG (alvimopán; anteriormente denominado Adolor/ADL 8-2698), conivaptán, y agentes relacionados descritos en el documento US 6.645.959.

## 1.3.1.6 Agentes antiobesidad

En una realización, una formulación de agonista de GCC es para su administración como parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la obesidad. Los ejemplos no limitativos de uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen: 11 $\beta$  HSD-I (11-betahidroxisteroide deshidrogenasa de tipo 1), inhibidores tales como BVT 3498, BVT 2733, 3-(1-adamantil)-4-etil-5-(etilíto)-4H-1,2,4-triazol, 3-(1-adamantil)-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-metil-4H-1,2,4-triazol, 3-adamantanil-4,5,6,7,8,9,10,11,12,3a-decahidro-1,2,4-triazolo[4,3-a][11]anuleno, y aquellos compuestos dados a conocer en los documentos WO01/90091, WO01/90090, WO01/90092 y WO02/072084; antagonistas de 5HT tales como los de los documentos WO03/037871, WO03/037887 y similares; moduladores de 5HT $\alpha$  tales como carbidopa, benserazida y los dados a conocer en los documentos US6207699, WO03/031439 y similares; agonistas de 5HT $2c$  (receptor 2c de serotonina), tales como BVT933, DPCA37215, IK264, PNU 22394, WAY161503, R-1065, SB 243213 (Glaxo SmithKline) y YM 348 y los dados a conocer en los documentos US3914250, WO00/77010, WO02/36596, WO02/48124, WO02/10169, WO01/66548, WO02/44152, WO02/51844, WO02/40456 y WO02/40457; moduladores del receptor de 5HT $6$ , tales como los de los documentos WO03/030901, WO03/035061, WO03/039547 y similares; acilestrógenos, tales como oleoil-estrona, dados a conocer en del Mar-Grasa, M. *et al.*, Obesity Research, 9:202-9 (2001) y el documento de solicitud de patente japonesa JP 2000256190; compuestos bicíclicos anorécticos tales como 1426 (Aventis) y 1954 (Aventis), y los compuestos dados a conocer en los documentos WO00/18749, WO01/32638, WO01/62746, WO01/62747 y WO03/015769; antagonistas de CB 1 (receptor cannabinoide-1)/agonistas inversos, tales como rimonabant (Acomplia; Sanofi), SR-147778 (Sanofi), SR-141716 (Sanofi), BAY 65-2520 (Bayer) y SLV 319 (Solvay), y los dados a conocer en los documentos de publicaciones de patente US4973587, US5013837, US5081122, US5112820, US5292736, US5532237, US5624941, US6028084, US6509367, US6509367, WO96/33159, WO97/29079, WO98/31227, WO98/33765, WO98/37061, WO98/41519, WO98/43635, WO98/43636, WO99/02499, WO00/10967, WO00/10968, WO01/09120, WO01/58869, WO01/64632, WO01/64633, WO01/64634,

WO01/70700, WO01/96330, WO02/076949, WO03/006007, WO03/007887, WO03/020217, WO03/026647,  
 WO03/026648, WO03/027069, WO03/027076, WO03/027114, WO03/037332, WO03/040107, WO03/086940,  
 WO03/084943 y EP658546; agonistas de CCK-A (colecistoquinina-A), tales como AR-R 15849, GI 181771 (GSK),  
 5 JMV-180, A-71378, A-71623 y SR146131 (Sanofi), y aquellos dados a conocer en el documento US5739106; CNTF  
 (factores neurotróficos ciliares), tales como GI-181771 (Glaxo-SmitKline), SR1 46131 (Sanofi Syntelabo),  
 butabindida, PD 170.292, y PD 149164 (Pfizer); derivados de CNTF, tales como Axokine® (Regeneron), y los dados  
 a conocer en los documentos WO94/09134, WO98/22128 y WO99/43813; inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV  
 (DP-IV), tales como tiazolidida isoleucina, pirrolidida valina, NVP-DPP728, LAF237, P93/01, P 3298, TSL 225 (ácido  
 10 triptofil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico; descrito por Yamada *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 8 (1998)  
 1537-1540), TMC-2A/2B/2C, inhibidores de CD26, FE 999011, P9310/K364, VIP 0177, SDZ 274-444, 2-  
 cianopirrolididas y 4-cianopirrolididas, tal y como se dan a conocer en Ashworth *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett.,  
 Vol. 6, nº 22, págs. 1163-1166 y 2745-2748 (1996) y los compuestos dados a conocer en los documentos de  
 publicaciones de patente: WO99/38501, WO99/46272, WO99/67279 (Probiodrug), WO99/67278 (Probiodrug),  
 15 WO99/61431 (Probiodrug), WO02/083128, WO02/062764, WO03/000180, WO03/000181, WO03/000250,  
 WO03/002530, WO03/002531, WO03/002553, WO03/002593, WO03/004498, WO03/004496, WO03/017936,  
 WO03/024942, WO03/024965, WO03/033524, WO03/037327 y EP1258476; agonistas/antagonistas del receptor de  
 secretagogo de la hormona del crecimiento, tales como NN703, hexarelina, MK-0677 (Merck), SM-130686, CP-  
 424391 (Pfizer), LY 444711 (Eli Lilly), L-692.429 y L-163.255, y aquellos como los dados a conocer en los  
 documentos USSN 09/662448, solicitud provisional US 60/203335, US6358951, US2002049196, US2002/022637,  
 20 WO01/56592 y WO02/32888; antagonistas/agonistas inversos de H3 (histamina H3), tales como tioperamida, 3-(1H-  
 imidazol-4-il)propil N-(4-pentenil)carbamato, clobenpropit, iodofenpropit, imoproxifano, GT2394 (Gliatech), y  
 A331440, O-[3-(1H-imidazol-4-il)propanol]carbamatos (Kiec-Kononowicz, K. *et al.*, Pharmazie, 55:349-55 (2000)),  
 antagonistas del receptor H3 de la histamina que contienen piperidina (Lazewska, D. *et al.*, Pharmazie, 56:927-32  
 (2001), derivados de benzofenona y compuestos relacionados (Sasse, A. *et al.*, Arch. Pharm. (Weinheim) 334:45-52  
 (2001)), fenilcarbamatos sustituidos en N (Reidemeister, S. *et al.*, Pharmazie, 55:83-6 (2000)), y derivados de  
 25 proxifano (Sasse, A. *et al.*, J. Med. Chem. 43:3335-43 (2000)) y moduladores del receptor H3 de la histamina, tales  
 como los dados a conocer en los documentos WO02/15905, WO03/024928 y WO03/024929; derivados de leptina,  
 tales como los dados a conocer en los documentos US5552524, US5552523, US5552522, US5521283,  
 WO96/23513, WO96/23514, WO96/23515, WO96/23516, WO96/23517, WO96/23518, WO96/23519 y WO96/23520;  
 30 leptina que incluye la leptina humana recombinante (PEG-OB, Hoffman La Roche) y metionil leptina humana  
 recombinante (Amgen); inhibidores de la lipasa, tales como tetrahidrolipstatina (orlistat/Xenical®), Triton WR1 339,  
 RHC80267, lipstatina, teasaponina, fosfato de dietilumbeliferilo, FL-386, WAY-121898, Bay-N-3176, valilactona,  
 esteracina, ebelactona A, ebelactona B y RHC 80267, y los dados a conocer en los documentos de publicaciones de  
 patente WO01/77094, US4598089, US4452813, US5512565, US5391571, US5602151, US4405644, US4189438 y  
 35 US4242453; moduladores del metabolismo lipídico tales como ácido maslínico, eritrodiol, ácido ursólico, uvaol,  
 ácido betulínico, betulina y similares, y los compuestos dados a conocer en el documento WO03/011267; agonistas de  
 Mc4r (receptor 4 de melanocortina), tales como CHIR86036 (Chiron), ME-10142, ME-10145 y HS-131 (Melacure), y  
 los dados a conocer en los documentos de publicación PCT WO99/64002, WO00/74679, WO01/991752,  
 WO01/25192, WO01/52880, WO01/74844, WO01/70708, WO01/70337, WO01/91752, WO02/059095,  
 40 WO02/059107, WO02/059108, WO02/059117, WO02/06276, WO02/12166, WO02/11715, WO02/12178,  
 WO02/15909, WO02/38544, WO02/068387, WO02/068388, WO02/067869, WO02/081430, WO03/06604,  
 WO03/007949, WO03/009847, WO03/009850, WO03/013509 y WO03/031410; moduladores de Mc5r (receptor 5 de  
 melanocortina), tales como los dados a conocer en los documentos WO97/19952, WO00/15826, WO00/15790,  
 US20030092041; antagonistas del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina (MCHR), tales como T-  
 45 226296 (Takeda), SB 568849, SNP-7941 (Synaptic), y los dados a conocer en los documentos de publicaciones de  
 patentes WO01/21169, WO01/82925, WO01/87834, WO02/051809, WO02/06245, WO02/076929, WO02/076947,  
 WO02/04433, WO02/51809, WO02/083134, WO02/094799, WO03/004027, WO03/13574, WO03/15769,  
 WO03/028641, WO03/035624, WO03/033476, WO03/033480, JP13226269 y JP1437059; moduladores de mGluR5  
 tales como los dados a conocer en los documentos WO03/029210, WO03/047581, WO03/048137, WO03/051315,  
 50 WO03/051833, WO03/053922, WO03/059904 y similares; agentes serotoninérgicos, tales como fenfluramina (tal  
 como Pondimin® (benzoetanamina, N-etil-alfa-metil-3-(trifluorometil)-, clorhidrato), Robbins), dexfenfluramina (tal  
 como Redux® (benzoetanamina, N-etil-alfa-metil-3-(trifluorometil)-, clorhidrato), Interneuron) y sibutramina  
 ((Meridia®, Knoll/Reductil®), incluyendo las mezclas racémicas, como isómeros ópticamente puros (+) y (-), y sales,  
 disolventes, hidratos, clatratos y profármacos de los mismos farmacéuticamente aceptables, que incluyen sales de  
 55 clorhidrato de sibutramina monohidrato de los mismos, y los compuestos dados a conocer en los documentos  
 US4746680, US4806570, US5436272 y US20020006964, WO01/27068, y WO01/62341; inhibidores del transporte  
 de NE (norepinefrina), tales como GW 320659, despiramina, talsupram y nomifensina; antagonistas de NPY 1, tales  
 como BIBP3226, J-115814, BIBO 3304, LY-357897, CP-671906, GI-264879A, y los dados a conocer en los  
 documentos US6001836, WO96/14307, WO01/23387, WO99/51600, WO01/85690, WO01/85098, WO01/85173 y  
 60 WO01/89528; antagonistas de NPY5 (neuropéptido Y Y5), tales como 152,804, GW-569180A, GW-594884A, GW-  
 587081X, GW-548118X, FR235208, FR226928, FR240662, FR252384, 1229U91, GI-264879A, CGP71683A, LY-  
 377897, LY-366377, PD-160170, SR-120562A, SR-120819A, JCF-104 y H409/22 y los compuestos dados a conocer  
 en los documentos de publicaciones de patente US6140354, US6191160, US6218408, US6258837, US6313298,  
 US6326375, US6329395, US6335345, US6337332, US6329395, US6340683, EP01010691, EP01044970,  
 65 WO97/19682, WO97/20820, WO97/20821, WO97/20822, WO97/20823, WO98/27063, WO00/107409,  
 WO00/185714, WO00/185730, WO00/64880, WO00/68197, WO00/69849, WO01/113917, WO01/09120,

WO01/14376, WO01/85714, WO01/85730, WO01/07409, WO01/02379, WO01/23388, WO01/23389, WO01/44201,  
 WO01/62737, WO01/62738, WO01/09120, WO02/20488, WO02/22592, WO02/48152, WO02/49648, WO02/051806,  
 WO02/094789, WO03/009845, WO03/014083, WO03/022849, WO03/028726 y Norman *et al.*, J. Med. Chem.  
 43:4288-4312 (2000); antagonistas de opioides, tales como nalmefeno (REVEX®), 3-metoxinaltrexona,  
 5 metilnaltrexona, naloxona y naltrexona (por ejemplo, PT901; Pain Therapeutics, Inc.) y los datos a conocer en los  
 documentos US20050004155 y WO00/21509; antagonistas de orexina, tales como SB-334867-A y los datos a  
 conocer en los documentos de publicaciones de patente WO01/96302, WO01/68609, WO02/44172, WO02/51232,  
 WO02/51838, WO02/089800, WO02/090355, WO03/023561, WO03/032991 y WO03/037847; inhibidores de PDE  
 10 (por ejemplo, compuestos que ralentizan la degradación de AMP cíclico (AMPC) y/o GMP cíclico (GMPc) mediante la  
 inhibición de las fosfodiesterasas, lo que puede conducir a un aumento relativo en la concentración intracelular de  
 AMPC y GMPc; posibles inhibidores de PDE son principalmente aquellas sustancias que van a figurar en la clase  
 que consiste en los inhibidores de PDE3, la clase que consiste en los inhibidores de PDE4 y/o la clase que consiste  
 en los inhibidores de PDE5, en particular aquellas sustancias que pueden designarse como tipos mixtos de  
 15 inhibidores PDE3/4 o como tipos mixtos de inhibidores PDE3/4/5) tales como los datos a conocer en los  
 documentos de publicaciones de patente DE1470341, DE2108438, DE2123328, DE2305339, DE2305575,  
 DE2315801, DE2402908, DE2413935, DE2451417, DE2459090, DE2646469, DE2727481, DE2825048,  
 DE2837161, DE2845220, DE2847621, DE2934747, DE3021792, DE3038166, DE3044568, EP000718, EP0008408,  
 EP0010759, EP0059948, EP0075436, EP0096517, EPO1 12987, EPO1 16948, EP0150937, EP0158380,  
 EP0161632, EP0161918, EP0167121, EP0199127, EP0220044, EP0247725, EP0258191, EP0272910, EP0272914,  
 20 EP0294647, EP0300726, EP0335386, EP0357788, EP0389282, EP0406958, EP0426180, EP0428302, EP0435811,  
 EP0470805, EP0482208, EP0490823, EP0506194, EP0511865, EP0527117, EP0626939, EP0664289, EP0671389,  
 EP0685474, EP0685475, EP0685479, JP92234389, JP94329652, JP95010875, US4963561, US5141931,  
 WO9117991, WO9200968, WO9212961, WO9307146, WO9315044, WO9315045, WO9318024, WO9319068,  
 WO9319720, WO9319747, WO9319749, WO9319751, WO9325517, WO9402465, WO9406423, WO9412461,  
 25 WO9420455, WO9422852, WO9425437, WO9427947, WO9500516, WO9501980, WO9503794, WO9504045,  
 WO9504046, WO9505386, WO9508534, WO9509623, WO9509624, WO9509627, WO9509836, WO9514667,  
 WO9514680, WO9514681, WO9517392, WO9517399, WO9519362, WO9522520, WO9524381, WO9527692,  
 WO9528926, WO9535281, WO9535282, WO9600218, WO9601825, WO9602541, WO9611917, DE3142982,  
 DE1116676, DE2162096, EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345 US6331543,  
 30 US20050004222 (incluyendo los datos a conocer en las fórmulas I-XIII y los párrafos 37-39, 85-0545 y 557 a 577),  
 WO9307124, EP0163965, EP0393500, EP0510562, EP0553174, WO9501338 y WO9603399, así como inhibidores  
 de PDE5 (por ejemplo, RX-RA-69, SCH-51866, KT-734, vesnarinona, zaprinast, SKF-96231, ER-21355, BF/GP-385,  
 NM-702 y sildenafil (Viagra<sup>TM</sup>)), inhibidores de PDE4 (tales como etazolato, ICI63197, RP73401, imazolidinona  
 (RO-20-1724), MEM 1414 (R1533/R1500; Pharmacia Roche), denbufilina, rolipram, oxagrelato, nitraquazona, Y-590,  
 35 DH-6471, SKF-94120, motapizona, lixazinona, indolidano, olprinona, atizoram, KS-506-G, dipamfilina, BMY-43351,  
 atizoram, arofilina, flilaminast, PDB-093, UCB-29646, CDP-840, SKF-107806, piclamilast, RS-17597, RS-25344-000,  
 SB-207499, tinebelast, SB-210667, SB-211572, SB-211600, SB-212066, SB-212179, GW-3600, CDP-840,  
 mopidamol, anagrelida, ibudilast, amrinona, pimobendano, cilostazol, quazinona y N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-  
 ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxibenzamida, inhibidores de PDE3 (tales como IC1153, 100, bemorandano (RWJ  
 40 22867), MCI-154, UD-CG 212, sulmazol, ampizona, cilostamida, carbazerano, piroximona, imazodano, CI-930,  
 siguazodano, adibendano, saterinona, SKF-95654, SDZ-MKS-492, 349-U-85, emoradano, EMD-53998, EMD-57033,  
 NSP-306, NSP-307, revizinona, NM-702, WIN-62582 y WIN-63291, enoximona y milrinona, inhibidores de PDE3/4  
 (tales como benafentrina, trequinsina, ORG-30029, zardaverina, L-686398, SDZ-ISQ-844, ORG-20241, EMD-54622,  
 y tolafentrina) y otros inhibidores de PDE (tales como vinpocetina, papaverina, enprofilina, cilomilast, fenoximona,  
 45 pentoxifilina, roflumilast, tadalafil (Cialis®), teofilina y vardenafilo (Levitra®); agonistas del neuropéptido Y2 (NPY2)  
 incluyen, pero no se limitan a: polipéptido YY y fragmentos y variantes de los mismos (por ejemplo, YY3-36 (PYY3-  
 36) (N. Engl. J. Med. 349:941, 2003; IKPEAPGE DASPEELNRY YASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID NO: XXX)) y  
 agonistas de PYY, tales como los datos a conocer en los documentos WO02/47712, WO03/026591, WO03/057235  
 y WO03/027637; inhibidores de la recaptación de serotonina, tales como, paroxetina, fluoxetina (Prozac<sup>TM</sup>),  
 50 fluvoxamina, sertralina, citalopram e imipramina, y los datos a conocer en los documentos US6162805, US6365633,  
 WO03/00663, WO01/27060 y WO01/162341;  $\beta$  agonistas de la hormona tiroidea, tales como KB-2611  
 (KaroBioBMS), y los datos a conocer en los documentos WO02/15845, WO97/21993, WO99/00353, GB98/284425,  
 n.º de Solicitud Provisional US 60/183.223, y n.º de solicitud de patente japonesa JP 2000256190; activadores de  
 UCP-1 (proteína de desacoplamiento-1), 2 ó 3, tales como ácido fitánico, ácido 4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-  
 55 tetrametil-2-naftalenil)-1-propenil]benzoico (TTNPB), ácido retinoico y los datos a conocer en el documento  
 WO99/00123; agonistas de  $\beta_3$  (receptor adrenérgico beta 3), tales como AJ9677/TAK677 (Dainippon/Takeda),  
 L750355 (Merck), CP331648 (Pfizer), CL-316.243, SB 418790, BRL-37344, L-796568, BMS-196085, BRL-35135A,  
 CGP12177A, BTA-243, GW 427353, Trecadrina, Zeneca D7114, N-5984 (Nisshin Kyorin), LY-377604 (Lilly), SR  
 59119A, y los datos a conocer en los documentos US5541204, US5770615, US5491134, US5776983, US488064,  
 60 US5705515, US5451677, WO94/18161, WO95/29159, WO97/46556, WO98/04526 y WO98/32753, WO01/74782,  
 WO02/32897, WO03/0141, WO03/016276, WO03/016307, WO03/024948, WO03/024953 y WO03/037881; agentes  
 noradrenérgicos, que incluyen pero sin limitarse a, dietilpropión (tal como Tenuate® (1-propanona, 2-(dietilamino)-1-  
 fenil-, clorhidrato), Merrell), dextroanfetamina (también conocida como sulfato de dextroanfetamina, dexanfetamina,  
 dexedrina, Dexampex, Ferndex, Oxydess II, Robese, Spancap n° 1), mazindol ((o 5-(p-clorofenil)-2,5-dihidro-3H-  
 65 imidazo[2,1-a]isoindol-5-ol), tales como Sanorex® Novartis, o Mazanor®, Wyeth Ayerst), fenilpropanolamina (o  
 benzometanol, alfa-(1-aminoetil)-, clorhidrato), fentermina ((o fenol, 3-[[4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)etil](4-metilfenil-

1)amino], monoclóhidrato), tal como Adipex-P®, Lemmon, FASTIN®, SmitKline Beecham y Ionamin®, Medeva), fendimetrazina ((o (2S,3S)-3,4-dimetil-2-fenilmorfolina, L-(+)-tartrato (1:1)), tal como Metra® (Forest), Plegine® (Wyeth-Ayerst), Prelu-2® (Boehringer Ingelheim) y Statobex® (Lemmon), tartrato de fendamina (como Tephorin® (2,3,4,9-tetrahidro-2-metil-9-fenil-1H-indenol[2,1-c]piridina, L-(+)-tartrato (1:1)), Hoffmann-LaRoche), metanfetamina (como Desoxin®, Abbot ((S)-N, clorhidrato de (alfa)-dimetilbenzoetanamina)), y tartrato de fendimetrazina (tal como cápsulas de liberación lenta Bontril®, Amarin (tartrato de 3,4-dimetil-2-fenilmorfolina); reguladores positivos/inductores de la oxidación de ácidos grasos, tales como Famoxin® (Genset); inhibidores de la monoamino oxidasa que incluyen pero no están limitados a befloxonona, moclobemida, brofaromina, fenoxatina, esuprona, befol, toloxatona, pirlindol, amiflamina, sercloremina, bazinaprina, lazabemida, milacemida, caroxazona y otros ciertos compuestos, tales como los que se dan a conocer en el documento WOO/12176; y otros agentes contra la obesidad tales como agonistas de 5HT-2, inhibidores de ACC (carboxilasa de acetil-CoA) tales como los dados a conocer en el documento WO03/072197, ácido alfa-lipoico (alfa-LA), AOD9604, supresores del apetito, tales como los de los documentos WO03/40107, ATL-962 (Alizyme PLC), benzocaina, clorhidrato de benzfetamina (Didrex), fuco (*Fucus vesiculosus*), agonistas de BRS3 (subtipo 3 del receptor de bombesina), bupropión, cafeína, agonistas de CCK, quitosano, cromo, ácido linoleico conjugado, agonistas de la hormona de liberación de corticotropina, dehidroepiandrosterona, inhibidores de DGAT1 (diacilglicerol aciltransferasa 1), inhibidores de DGAT2 (diacilglicerol aciltransferasa 2), inhibidores del transportador de dicarboxilato, efedra, exendina-4 (un inhibidor de glp-1), inhibidores de FAS (ácido graso sintasa) (tales como cerulenina y C75), inhibidores de la reabsorción de la grasa (tales como los del documento WO03/053451 y similares), inhibidores del transportador de ácidos grasos, fibras naturales solubles en agua (tales como psillium, plantago, guar, avena, pectina), antagonistas de galanina, galega (*Ruda cabruna*), garcinia cambogia, camedrio (*Teucrium chamaedrys*), anticuerpos de grelina y antagonistas de grelina (tales como los dados a conocer en los documentos WOO1/87335 y WO02/08250), hormonas polipeptídicas y sus variantes que afectan a la secreción de las células de los islotes, tales como las hormonas secretina/polipéptido inhibidor gástrico (GIP)/polipéptido intestinal vasoactivo (VIP)/polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP)/polipéptido II similar al glucagón (GLP-II)/glicentina/familia de genes del glucagón y/o de la familia génica de polipéptidos relacionados con el gen de la adrenomedulina/amilina/calcitonina (CGRP) que incluyen agonistas de GLP-1 (polipéptido 1 similar al glucagón) (por ejemplo (1) exendina-4, (2) aquellas moléculas de GLP-1 descritas en el documento US20050130891 incluyendo GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37) en su forma carboxilada o amidada C-terminal o como polipéptidos GLP-1 modificados y modificaciones de los mismos, que incluyen las descritas en los párrafos 17-44 del documento US20050130891, y derivados obtenidos a partir de GLP-1-(7-34)COOH y se emplea la amida del ácido correspondiente que tiene la siguiente fórmula general: R-NH-HAEGTFTSDVSYLEGQAAKEFIWLVK-CONH<sub>2</sub> en la que R=H o un compuesto orgánico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, R es el residuo de un ácido carboxílico. Particularmente preferidos son los siguientes residuos de ácidos carboxílicos: formilo, acetilo, propionilo, isopropionilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo) y glp-1 (polipéptido 1 similar a glucagón), antagonistas de glucocorticoides, inhibidores de transportadores de la glucosa, secretagogos de la hormona de crecimiento (tales como los mencionados y dados a conocer específicamente en el documento US5536716), interleucina-6 (IL-6) y moduladores de la misma (como en el documento WO03/057237 y similares), L-carnitina, agonistas de Mc3r (receptor 3 de melanocortina), agonistas/antagonistas de MCH2R (hormona 2R concentradora de melanina), antagonistas de la hormona concentradora de melanina, agonistas de la melanocortina (tales como Melanotano II o los descritos en los documentos WO 99/64002 y WO 00/74679), hierba nomame, inhibidores del transportador de fosfato, compuesto fitofármaco 57 (CP 644,673), piruvato, inhibidores de SCD-1 (estearoil-CoA desaturasa-1), T71 (Tularik, Inc., Boulder CO), topiramato (Topimax®, indicado como anticonvulsivo que ha demostrado que aumenta la pérdida de peso), moduladores del factor de transcripción (tales como los dados a conocer en el documento WO03/026576), inhibidores de la β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa-1 (β-HSD-1), β-hidroxi-β-metilbutirato, p57 (Pfizer), zonisamida (Zonegran™, indicado como antiepiléptico que ha demostrado que conduce a la pérdida de peso), y los agentes dados a conocer en el documento US20030119428, párrafos 20-26.

### 1.3.1.7 Inhibidores de fosfodiesterasa

En determinadas realizaciones, el régimen de la terapia de combinación incluye la administración de uno o más inhibidores de fosfodiesterasa ("PDE"). Los inhibidores de PDE ralentizan la degradación del AMP cíclico (AMPc) y/o GMP cíclico (GMPc) mediante la inhibición de fosfodiesterasas, lo que puede conducir a un aumento relativo en la concentración intracelular de AMPc y/o GMPc. Los ejemplos no limitativos de los inhibidores de PDE que pueden usarse en combinación con los agonistas de GCC de la invención incluyen inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4 y/o inhibidores de PDE5, en particular aquellas sustancias que pueden designarse como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4 o como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4/5. Se describen ejemplos no limitativos de tales inhibidores de PDE en las siguientes solicitudes y patentes: DE1470341, DE2108438, DE2123328, DE2305339, DE2305575, DE2315801, DE2402908, DE2413935, DE2451417, DE2459090, DE2646469, DE2727481, DE2825048, DE2837161, DE2845220, DE2847621, DE2934747, DE3021792, DE3038166, DE3044568, EP000718, EP0008408, EP0010759, EP0059948, EP0075436, EP0096517, EPO1 12987, EPO1 16948, EP0150937, EP0158380, EP161632, EP0161918, EP0167121, EP0199127, EP0220044, EP0247725, EP0258191, EP0272910, EP0272914, EP0294647, EP0300726, EP0335386, EP0357788, EP0389282, EP0406958, EP0426180, EP0428302, EP0435811, EP0470805, EP0482208, EP0490823, EP0506194, EP0511865, EP0527117, EP0626939, EP0664289, EP0671389, EP0685474, EP0685475, EP0685479, JP92234389, JP94329652, JP95010875, n.<sup>os</sup> de patente estadounidense 4.963.561, 5.141.931, WO9117991, WO9200968, WO9212961,

WO930714, WO9315044, WO9315045, WO9318024, WO9319068, WO9319720, WO9319747, WO9319749, WO9319751, WO9325517, WO9402465, WO9406423, WO9412461, WO9420455, WO9422852, WO9425437, WO9427947, WO9500516, WO9501980, WO9503794, WO9504045, WO9504046, WO9505386, WO9508534, WO9509623, WO9509624, WO9509627, WO9509836, WO9514667, WO9514680, WO9514681, WO9517392, 5 WO9517399, WO9519362, WO9522520, WO9524381, WO9527692, WO9528926, WO9535281, WO9535282, WO9600218, WO9601825, WO9602541, WO9611917, DE3142982, DE1 116676, DE2162096, EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345, US6.331.543, USA20050004222 (incluyendo los descritos en las fórmulas I-XIII y los párrafos 37-39, 85-0545 y 557-577) y WO9307124, EP0163965, EP0393500, EP0510562, EP0553174, WO9501338 y WO9603399. Inhibidores de PDE5 que pueden mencionarse a modo de ejemplo son 10 RX-RA-69, SCH-51866, KT-734, vesnarinona, zaprinast, SKF-96231, ER-21355, BF/GP-385, NM-702 y sildenafil (Viagra®). Los inhibidores de PDE4 que pueden mencionarse a modo de ejemplo son RO-20-1724, MEM 1414 (R1533/1500; Pharmacia Roche), denbufilina, rolipram, oxagrelato, nitraquazona, Y-590, DH-6471, SKF 94120, motapizona, lixazinona, indolidano, olprinona, atizoram, KS-506-G, dipamfilina, BMY-43351, atizoram, arofilina, filaminast, PDB-093, UCB-29646, CDP-840, SKF-107806, piclamilast, RS-17597, RS-25344-000, SB-207499, 15 tinebelast, SB-210667, SB-211572, SB-211600, SB-212066, SB-212179, GW-3600, CDP-840, mopidamol, anagrelida, ibudilast, amrinona, pimobendano, cilostazol, quazinona y N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxibenzamida. Los inhibidores de PDE3 que pueden mencionarse a modo de ejemplo son sulmazol, ampizona, cilostamida, carbazerano, piroximona, imazodano, CI-930, siguazodano, adibendano, saterinona, SKF-95654, SDZ-MKS-492, 349-U-85, emoradano, EMD-53998, EMD-57033, NSP-306, NSP-307, revizinona, NM-702, 20 WIN-62582 y WIN-63291, enoximona y milrinona. Los inhibidores de PDE3/4 que pueden mencionarse a modo de ejemplo son benafentrina, trequinsina, ORG-30029, zardaverina, L-686398, SDZ-ISQ-844, ORG-20241, EMD 54622 y tolafentrina. Otros inhibidores de PDE incluyen: cilomilast, pentoxifilina, roflumilast, tadalafil (Cialis®), teofilina y vardenafilo (Levitra®), zaprinast (específico de PDE5). Agonista de GCC

### 25 1.3.1.8 Agentes analgésicos

En determinadas realizaciones, el régimen de terapia de combinación incluye la administración de uno o más agentes analgésicos, por ejemplo, un compuesto analgésico o un polipéptido analgésico. En algunas realizaciones, la formulación de agonista de GCC se administra simultáneamente o secuencialmente con uno o más agentes 30 analgésicos. En otras realizaciones, el agonista de GCC se enlaza o se une covalentemente a un agente analgésico para crear un conjugado terapéutico. Los ejemplos no limitativos de agentes analgésicos que pueden usarse incluyen bloqueantes de canales de calcio, antagonistas de receptores 5HT (por ejemplo antagonistas de receptores 5HT<sub>3</sub>, 5HT<sub>4</sub> y 5HT<sub>1</sub>), agonistas de receptores de opioides (loperamida, fedotozina y fentanilo), antagonistas de receptor de NK1, agonistas de receptor de CCK (por ejemplo, loxiglumida), antagonistas de receptor de NK1, 35 antagonistas de receptor de NK3, inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina (NSRI), agonistas de receptores vainilloides y cannabinoides, y sialorfina. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de agentes analgésicos en las diversas clases.

En una realización, el agente analgésico es un polipéptido analgésico seleccionado del grupo que consiste en 40 polipéptidos relacionados con sialorfina, incluyendo los que comprenden la secuencia de aminoácidos QHNPR (SEQ ID NO: 250), incluyendo: VQHNPR (SEQ ID NO:251); VRQHNPR (SEQ ID NO:252); VRGQHNPR (SEQ ID NO:253); VRGPQHNPR (SEQ ID NO:254); VRGPRQHNPR (SEQ ID NO:255); VRGPRRQHNPR (SEQ ID NO:256); y RQHNPR SEQ ID NO:257). Los polipéptidos relacionados con sialorfina se unen a neprilisina e inhiben la descomposición mediada por neprilisina de sustancia P y Met-enkefalina. Por tanto, compuestos o polipéptidos que 45 son inhibidores de neprilisina son agentes analgésicos útiles que pueden administrarse con los agonistas de GCC descritos en el presente documento o unirse covalentemente a un agonista de GCC para formar un conjugado terapéutico. Se describen polipéptidos de sialorfina y relacionados en la patente estadounidense 6.589.750; documentos U.S. 20030078200 A1; y WO 02/051435 A2.

En otra realización, una formulación de agonista de GCC de la invención se administra como parte de un régimen de 50 terapia de combinación con un agonista o antagonista de receptores de opioides. En una realización, el agonista de GCC y el agonista o antagonista de receptores de opioides se unen por medio de un enlace covalente. Los ejemplos no limitativos de antagonistas de receptores de opioides incluyen naloxona, naltrexona, metilnaloxona, nalmefeno, cipridima, beta-funaltrexamina, naloxonazina, naltrindol, nor-binaltorfina, pentapéptido de enkefalina (HOE825; Tyr-D-Lys-Gly-Phe-L-homoserina; SEQ ID NO:258), trimebutina, polipéptido intestinal vasoactivo, gastrina, glucagones. Los ejemplos no limitativos de agonistas de receptores de opioides incluyen fedotozina, asimadolina y 55 ketociclazocina, los compuestos descritos en los documentos WO03/097051 y WO05/007626, morfina, difenilxilato, frakefamida (H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH<sub>2</sub>; SEQ ID NO:259; WO 01/019849 A1), y loperamida.

Además los ejemplos no limitativos de agentes analgésicos que pueden usarse en un régimen de terapia de 60 combinación junto con las formulaciones de agonista de GCC de la invención incluyen el dipéptido Tyr-Arg (kytorfina); el polipéptido derivado de cromogranina (CgA 47-66; véase, por ejemplo, Ghia *et al.* 2004 Regulatory polipeptides 119:199); agonistas de receptor de CCK tales como caeruleina; polipéptidos de conotoxina; análogos peptídicos de timulina (solicitud FR 2830451); antagonistas de receptor de CCK (CCKa o CCKb), incluyendo 65 loxiglumida y dexloxiglumida (el isómero R de loxiglumida) (documento WO 88/05774); agonistas de 5-HT<sub>4</sub> tales como tegaserod (Zelnorm®), mosaprida, metoclopramida, zacoprida, cisaprida, renzaprida, derivados de

bencimidazolona tales como BIMU 1 y BIMU 8, y lilexaprida; bloqueantes de canales de calcio tales como ziconotida y compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, los documentos EP625162B1, US 5.364.842, US 5.587.454, US 5.824.645, US 5.859.186, US 5.994.305, US 6.087.091, US 6.136.786, WO 93/13128 A1, EP 1336409 A1, EP 835126 A1, EP 835126 B1, US 5.795.864, US 5.891.849, US 6.054.429, WO 97/01351 A1; antagonistas de receptor de NK-1 tales como aprepitant (Merck & Co Inc), vofopitant, ezlopitant (Pfizer, Inc.), R-673 (Hoffmann-La Roche Ltd), SR-48968 (Sanofi Synthelabo), CP-122,721 (Pfizer, Inc.), GW679769 (Glaxo Smith Kline), TAK-637 (Takeda/Abbot), SR-14033, y compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, los documentos EP 873753 A1, US 20010006972 A1, US 20030109417 A1, WO 01/52844 A1 (para una revisión véase Giardina *et al.* 2003. *Drugs* 6:758); antagonistas de receptor de NK-2 tales como nepadutant (Menarini Ricerche SpA), saredutant (Sanofi-Synthelabo), GW597599 (Glaxo Smith Kline), SR-144190 (Sanofi-Synthelabo) y UK-290795 (Pfizer Inc); antagonistas de receptor de NK3 tales como osanetant (SR-142801; Sanofi-Synthelabo), SSR-241586, talnetant y compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, los documentos WO 02/094187 A2, EP 876347 A1, WO 97/21680 A1, US 6,277,862, WO 98/1 1090, WO 95/28418, WO 97/19927, y Boden *et al.* (*J Med Chem.* 39:1664-75, 1996); inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina (NSRI) tales como milnaciprán y compuestos relacionados descritos en el documento WO 03/077897; y antagonistas de receptor vainilloide tales como arvanil y compuestos relacionados descritos en el documento WO 01/64212 A1.

Además de polipéptidos relacionados con sialorfina, los polipéptidos analgésicos incluyen: AspPhe, endomorfina-1, endomorfina-2, nocistatina, dalargina, luprón, ziconotida y sustancia P.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Síntesis y purificación de péptidos agonistas de GCC

Los péptidos agonistas de GCC se sintetizaron usando métodos convencionales para la síntesis de péptidos en fase sólida. Se seleccionó una estrategia de grupo protector Boc/Bzl o Fmoc/tBu, dependiendo de la magnitud del péptido que se iba a producir. En el caso de cantidades más pequeñas, es posible obtener el producto deseado usando un protocolo de Fmoc/tBu, pero para cantidades más grandes (1 g o más), Boc/Bzl es superior.

En cada caso, el péptido agonista de GCC se inició, o bien usando una resina Wang cargada previamente (Fmoc) o bien Merrifield (Boc) o bien Pam (Boc). Para los productos con Leu C-terminal, resina Fmoc-Leu-Wang (D-1115) o Boc-Leu-Pam (D-1230) o Boc-Leu-Merrifield (D-1030). Por lo tanto, para los péptidos que contenían d-Leu C-terminal, la resina fue resina Fmoc-dLeu-Wang (D-2535) y Boc-dLeu-Merrifield, Boc-dLeu-Pam (Producto Bachem D-1230 y D-1590, respectivamente) (SP-332 y análogos relacionados). Para los péptidos producidos como amidas C-terminales, se utilizó una resina con ligador Ramage (Producto Bachem D-2200) (Fmoc) o mBHA (Boc) (Producto Bachem D-30 1210 y se cargó con el residuo C-terminal como la primera etapa de la síntesis.

#### Visión general de Fmoc-tBu

Cada ciclo de síntesis consistió en la desprotección con piperidina al 20% en DMF. Los lavados de la resina se realizaron alternando DMF e *l*pOH para hinchar y encoger la resina, respectivamente. La síntesis de péptidos alargaba la cadena desde el extremo C-terminal al N-terminal. La química de activación para cada aminoácido era con HBTU/DIEA, con un exceso de 4 veces durante 45 minutos. En químicas automatizadas, cada aminoácido se acopló doblemente para maximizar la eficacia del acoplamiento. Para asegurar la posición correcta de los enlaces disulfuro, los residuos de Cys se introdujeron como Cys(Acm) en las posiciones 15 y 7. Se colocó Cys(Trt) en Cys4 y Cys12. Esta estrategia de grupo protector produce el topoisómero correcto como producto dominante (75:25). (Para los análogos de la enterotoxina, se utilizó un tercer grupo protector de enlaces disulfuro (Mob)).

Para los péptidos que contenían grupos C-terminales Aeea (aminoetiloxietiloxiacetilo), éstos se acoplaron con un ligador de amida Ramage, usando la misma química de activación que anteriormente, usando un derivado de Aeea protegido con Fmoc. La numeración de Cys en estos casos sigue siendo la misma y el posicionamiento de los grupos protectores también. Para los péptidos que contienen la extensión N-terminal de Aeea, la numeración del residuo Cys se aumentará en tres, Cys4 se convierte en Cys7, Cys12 se convierte en Cys15, Cys7 se convierte en Cys10 y Cys15 se convierte en Cys18. La última pareja está protegida con Acm y la pareja anterior mantiene los grupos Trt.

Para los análogos que contienen sustituciones de D-aminoácidos, éstas se introdujeron directamente mediante la incorporación del derivado protegido correctamente en la posición deseada, usando la química de activación descrita en el presente documento. Para las estrategias de Fmoc, se utilizaría Fmoc-dAsn(Trt)-OH, Fmoc-dAsn(Xan)-OH, Fmoc-dAsp(tBu)-OH, Fmoc-dGlu(tBu)-OH y para las estrategias de Boc, Boc-dAsn(Xan)-OH, Boc-dAsn(Trt)-OH, Boc-dAsp(Chx), Boc-dAsp(Bzl)-OH, Boc-dGlu(Chx)-OH y Boc-dGlu(Bzl)-OH.

Cada péptido se escinde del soporte en fase sólida usando una mezcla de escisión de TFA:H<sub>2</sub>O:trisisopropilsilano (8,5:0,75:0,75) ml/g de resina durante 2 horas a TA. El péptido desprotegido bruto se filtra para eliminar las perlas de resina gastada y se precipitó en dietil éter enfriado en hielo.

Cada enlace disulfuro se introdujo ortogonalmente. Brevemente, el producto sintético bruto se disolvió en agua que contenía  $\text{NH}_4\text{OH}$  para aumentar el pH a 9. Después de la solubilización completa del producto, se hizo el enlace disulfuro entre los residuos de Cys desprotegidos en Trt, mediante valoración con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El producto monocíclico se purificó mediante RP-HPLC. El producto monocíclico purificado se trató posteriormente con una solución de yodo para eliminar simultáneamente los grupos protectores Acm e introducir el segundo enlace disulfuro.

Para los análogos de la enterotoxina, el grupo Mob se eliminó mediante tratamiento del producto dicíclico con TFA al 85% que contenía DMSO al 10% y tioanisol al 5% durante 2 horas a TA.

Cada producto se purificó a continuación mediante RP-HPLC usando un sistema de combinación de tampón de TEAP en  $\text{H}_2\text{O}$ , frente a MeCN, seguido por TFA en  $\text{H}_2\text{O}$  frente a MeCN. Las fracciones muy puras se combinaron y se liofilizaron. El producto final fue convertido en una sal de acetato mediante intercambio iónico con una resina Dow-Ex cargada con acetato o mediante RP-HPLC usando una etapa de lavado con base con  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , seguido de AcOH al 1% en agua frente a MeCN.

También es posible preparar análogos de enterotoxina utilizando una metodología de oxidación aleatoria usando Cys(Trt) en Fmoc o Cys(MeB) en Boc. Después de la escisión, los enlaces disulfuro se pueden formar usando parejas redox de intercambio de disulfuro tales como glutatión (red/ox) y/o cisteína/cistina. Este proceso producirá un producto plegado en el que las parejas de disulfuro deben determinarse ya que no habría manera de saber su posición directamente.

#### *Procedimiento de Boc-Bzl*

La síntesis de péptidos se inicia en una resina Merrifield o Pam cargada previamente o con mBHA para péptidos producidos como amidas C-terminales. Cada ciclo de síntesis consta de una etapa de desprotección con TFA al 50% en  $\text{MeCl}_2$ . Se lava la resina repetidamente con  $\text{MeCl}_2$  y MeOH. Se neutraliza la sal de TFA formada con un lavado con base de TEA al 10% en  $\text{MeCl}_2$ . Se lava la resina con MeOH y  $\text{MeCl}_2$  y finalmente con DMF antes de las etapas de acoplamiento. Se realiza una prueba colorimétrica para asegurar la desprotección. Cada acoplamiento está mediado con diisopropilcarbodiimida con HOBt para formar el éster activo. Se permite que cada acoplamiento continúe durante 2 horas a TA o durante la noche en los acoplamientos difíciles. Se llevan a cabo los reacoplamientos con o bien reactivos de uranio o bien reactivos de fosfonio hasta que se obtiene una prueba colorimétrica negativa para las aminas primarias libres. Entonces se lava la resina con DMF, MeOH y  $\text{MeCl}_2$  y se prepara para la siguiente etapa en fase sólida. La protección Cys utiliza Cys(Acm) en las posiciones 7 y 15, y Cys(MeB) en Cys4 y Cys12.

Se realiza la escisión y la desprotección simultánea por tratamiento con HF utilizando anisol como eliminador (9:1:1) ml:ml:g (resina) a  $0^\circ\text{C}$  durante 60 min. Posteriormente se extrae el péptido de la resina y se precipita en éter enfriado con hielo. La introducción de enlaces disulfuro y la purificación siguen exactamente el mismo protocolo descrito anteriormente para el producto producido con Fmoc.

#### **Ejemplo 2: Estabilidad biológica y química *in vitro* de SP-304 después de la incubación en fluido gástrico simulado (FGS)**

Se determinó la estabilidad de SP-304 en presencia de fluido gástrico simulado (FGS) mediante mediciones de la actividad biológica y análisis con HPLC (figuras 1A y 1B). Se incubó SP-304 (concentración final de 8,5 mg/ml) en FGS (peptona proteosa (8,3 g/litro; Difco), D-glucosa (3,5 g/litro; Sigma), NaCl (2,05 g/litro; Sigma),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,6 g/litro; Sigma),  $\text{CaCl}_2$  (0,11 g/litro), KC1 (0,37 g/litro; Sigma), bilis porcina (concentración final 1 X 0,05 g/litro; Sigma) en PBS, lisozima (concentración final 1 X 0,10 g/litro; Sigma) en PBS, pepsina (concentración final 1 X, 0,0133 g/litro; Sigma) en PBS). Se preparó el FGS el día del experimento y se ajustó el pH a  $2,0 \pm 0,1$  usando HCl o NaOH según fuera necesario. Después de ajustar el pH, se esteriliza el FGS por filtración con filtros de membrana de  $0,22 \mu\text{m}$ . Se incubó SP-304 (concentración final de 8,5 mg/ml) en FGS a  $37^\circ\text{C}$  durante 0, 15, 30, 45, 60 y 120 min, respectivamente en alícuotas por triplicado. Tras las incubaciones, se congelaron las muestras rápidamente en hielo seco, y se almacenaron a continuación en un congelador a  $-80^\circ\text{C}$  hasta que se realizaron los ensayos por duplicado.

La figura 1A muestra un diagrama de barras que muestra la actividad biológica de SP-304 tras la incubación con SGF durante los tiempos indicados. La actividad a 0 min se tomó como el 100%. Los datos son un promedio de triplicados  $\pm$  DE para cada punto de tiempo. Los datos demuestran que SP-304 es resistente a la descomposición en SGF durante incubaciones que duran tanto como dos horas. Además, los datos también sugieren que la actividad de SP-304 no se ve alterada por la exposición al pH ácido del SGF.

En la figura 1b se muestran los cromatogramas de HPLC de muestras de SP-304 incubadas en SGF durante 0 y 120 min. En este caso, se analizaron alícuotas de las dos muestras mediante HPLC usando un método desarrollado anteriormente para analizar el péptido SP-304. Se diluyeron muestras de las incubaciones en SGF para dar una concentración final de 0,17 mg/ml de SP-304. El pico principal de SP-304 no cambió tras la incubación con SGF, lo que indica que el péptido era resistente al tratamiento con SGF.

**Ejemplo 3: Estabilidad biológica y química *in vitro* de SP-304 después de la incubación en fluido intestinal simulado (FIS)**

También se evaluó la estabilidad de SP-304 tras la incubación con fluido intestinal simulado (SIF) midiendo su actividad biológica y mediante análisis de HPLC (figuras 2A y 2B). Se preparó la disolución de SIF mediante el método descrito en la farmacopea estadounidense, 24<sup>a</sup> edición, p. 2236. La receta para preparar la disolución de SIF fue tal como se describe a continuación. La disolución de SIF contenía NaCl (2,05 g/litro; Sigma), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,6 g/litro; Sigma), CaCl<sub>2</sub> (0,11 g/litro), KCl (0,37 g/litro; Sigma) y pancreatina 10 mg/ml. Se ajustó el pH a 6 y se esterilizó la disolución por filtración. Se incubó una disolución de SP-304 (8,5 mg/ml) en SGF a 37°C durante 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 300 min respectivamente, en alícuotas por triplicado. Tras las incubaciones, se retiraron las muestras y se congelaron inmediatamente con hielo seco y se almacenaron en un congelador a -80°C hasta que se sometieron a ensayo por duplicado. La figura 2A es un diagrama de barras que muestra la capacidad de SP-304, tras la incubación en SIF durante los tiempos indicados, para estimular la síntesis de GMPc en células T84. La actividad de estimulación de GMPc a 0 min se tomó como el 100%. Los datos son un promedio de 3 triplicados  $\pm$  DE. Los datos indican que la actividad biológica de SP-304 se reduce en aproximadamente el 30% tras la incubación en SIF durante 300 min.

Se evaluó la estabilidad física del péptido SP-304 expuesto a SIF mediante HPLC usando el método descrito para la digestión con SGF. La figura 2B muestra cromatogramas de HPLC para SP-304 tras la incubación con SIF inactivado por calor durante 300 min, y SIF durante 120 min, respectivamente. SP-304 tratado con SIF inactivado por calor permaneció intacto (nota: el pico principal de SP-304 que eluye a 16,2 min), mientras que SP-304 tratado con SIF durante 120 min se convirtió completamente en otro pico que eluye a 9,4 min más unos cuantos picos adicionales menores.

La figura 3 es una representación esquemática de los posibles metabolitos de SP-304. Los productos de degradación principales implican Asn y Asp cortados del extremo N-terminal y Leu del extremo C-terminal de SP304. El hecho de que sólo se observara una reducción del 30% en la actividad biológica incluso tras 2 horas de incubación en SIF implica que uno o más de los productos de degradación observados en la figura 2B también son biológicamente activos. Para abordar esta posibilidad, se sintetizaron varios péptidos truncados y se evaluaron para determinar sus capacidades para estimular la síntesis de GMPc en células T84 (figura 4).

La figura 4 muestra datos de los análisis de diversos péptidos en el ensayo de estimulación de GMPc de células T84 (esencialmente tal como se describe en Shailubhai, *et al.*, Cancer Research 60, 5151-5157 (2000). En resumen, se lavaron dos veces monocapas confluentes de células T-84 en placas de 24 pocillos con 250  $\mu$ l de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) y se preincubaron a 37°C durante 10 minutos con 250  $\mu$ l de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) e isobutilmetilxantina 1 mM (IBMX). Entonces se incubaron monocapas de células T84 con 250  $\mu$ l de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) que contenía uno de los péptidos mostrados en la figura 4 a una concentración de 1,0  $\mu$ M durante 30 min. Tras la incubación de 30 min, se aspiró el medio y se terminó la reacción mediante la adición de ácido perclórico al 3%. Tras la centrifugación y la adición de NaOH (0,1 N) para neutralizar el pH, se determinaron los niveles de GMPc intracelulares en lisados usando un kit de ELISA de GMPc (n.º de cat. 581021; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Se ejecutaron las incubaciones de péptidos por duplicado, y se ejecutaron muestras tomadas de cada incubación como duplicados en la prueba de ELISA.

Los datos indican que SP-338, el péptido de 15 meros que carece del residuo de leucina (L) en el extremo C-terminal de SP-304, conserva aproximadamente el 80% de la actividad biológica del péptido SP-304 de 16 meros de longitud completa. Por tanto, la Leu C-terminal claramente realiza alguna contribución a la potencia biológica del péptido. De manera similar, los péptidos SP-327, SP-329 y SP-331, que carecen todos de su Leu C-terminal, también mostraron una reducción del 20-25% en la potencia biológica en relación con sus péptidos originales homólogos SP-326, SP-328 y SP-330, respectivamente. Además, los datos también sugieren que los residuos de aminoácido en el extremo N-terminal también pueden contribuir a la estabilidad y/o potencia de los péptidos. Se sintetizaron varios péptidos adicionales con formas D de aminoácidos reemplazando a las correspondientes formas L en los extremos C- y N-terminales de los péptidos. Se evaluaron estos péptidos para determinar sus capacidades para estimular la síntesis de GMPc en células T84 tal como se muestra en la figura 5.

Los resultados presentados en la figura 5 indican que la sustitución de L-aminoácidos por D-aminoácidos en los extremos C- y N-terminales no alteró significativamente su potencia en relación con SP-304. Los péptidos SP-332, SP-333 y SP-335 mostraron toda estabilidad comparable para estimular la síntesis de GMPc en células T84. Estos resultados sugieren que los residuos de aminoácido Asn, Asp y Glu en el extremo N-terminal y Leu en el extremo C-terminal pueden reemplazarse por sus respectivas formas de D-aminoácido. Por otro lado, sustitución de L-leucina por D-leucina en la 6<sup>a</sup> posición (SP-337) dio como resultado prácticamente la pérdida completa de actividad biológica.

La figura 7 (A-F) muestra las estabildades de los péptidos SP-332, SP-333 y SP-304 cuando se incuban en SIF durante dos horas. Los resultados demuestran que SP-333, que tiene una D-Asn en el extremo N-terminal y D-Leu en el extremo C-terminal, permanecieron activos biológicamente al 100% prácticamente tras una incubación de dos

horas en SIF (figura 7A), y permanecieron prácticamente intactos frente a la digestión con SIF tras dos horas (figuras 7F-1 y 7F-2). Estudios de incubación posteriores con SP-333 realizados en SIF durante hasta 24 horas indican que hay muy poca degradación incluso tras 24 horas en SIF (figura 7G). Los datos indicaron que SP-333 es estable frente a la digestión con SIF durante hasta 24 horas. El péptido SP-332 con D-Leu en el extremo C-terminal mostró una reducción menor en la potencia tras la incubación de 120 min con SIF (figura 7B). De manera interesante, los análisis de HPLC de SP-332 no revelaron ninguna degradación bien definida del péptido (figura 7E-1 y 7E2), lo que sugiere también que este péptido es también casi completamente resistente a la proteólisis por SIF durante la incubación de 2 h. Por otro lado, el péptido SP-304 perdió aproximadamente el 30% de su potencia tras la digestión con SIF durante tan sólo una hora (figura 7C). El análisis de HPLC de SP-304 tras la incubación con SIF confirmó su degradación (figura 7D-1 y 7D-2). Estos resultados sugieren que SP-304 experimenta proteólisis sustancial tras la incubación con SIF en el plazo de una hora.

#### Ejemplo comparativo 4: Ensayos de estimulación de GMP cíclico

Se sometieron a prueba la capacidad del péptido agonista de GCC para unirse a y activar el receptor intestinal de GC-C usando la línea celular de carcinoma de colon humano T84. Se obtuvieron células de carcinoma de colon humano T84 a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Se hicieron crecer las células en una mezcla 1:1 de medio Ham F-12 y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 U de penicilina/ml y 100 µg/ml de estreptomycin. Se alimentaron las células con medio de nuevo aporte cada tercer día y se dividieron con una confluencia de aproximadamente el 80%.

Se sometió a ensayo la actividad biológica de los péptidos agonistas de GCC tal y como se ha notificado anteriormente (Shailubhai, *et al.*, Cancer Research 60, 5151-5157 (2000)). En resumen, se lavaron las monocapas confluentes de células T-84 en placas de 24 pocillos dos veces con 250 µl de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4), se preincubaron a 37°C durante 10 min con 250 µl de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) e isobutilmetilxantina 1 mM (IBMX), seguido por incubación con péptidos agonistas de GCC (de 0,1 nM a 10 µM) durante 30 min. Se aspiró el medio, y se terminó la reacción mediante la adición de ácido perclórico al 3%. Después de la centrifugación y la neutralización con NaOH 0,1 N, se utilizó el material sobrenadante directamente para las mediciones de GMPc utilizando un kit de ELISA (Caymen Chemical, Ann Arbor, MI).

La figura 6 muestra resultados de experimentos que evalúan la potencia de péptidos (por medio del ensayo de estimulación de GMPc) que tienen estructuras similares al péptido de 14 meros SP-339, también denominado linaclotida. SP-339 es un análogo truncado del péptido ST de enterotoxina de *E. coli*. Se encontró que SP-354 era prácticamente idéntico a SP-339 en actividad biológica. De manera notable, se encontró que el péptido SP-353, que tiene un residuo de Ser en la 6ª posición, era más potente que SP-339, y era el más potente de todos los péptidos sometidos a prueba. El péptido SP-355 que tiene una D-Tyr en el extremo C-terminal mostró considerablemente menos potencia que los otros péptidos sometidos a prueba.

#### Ejemplo 5: Péptidos pegilados

Una estrategia adicional para hacer que los péptidos sean más resistentes a la digestión con proteasas digestivas es pegarlos en el extremo N y C-terminal. El péptido SP-333 se pegila con el grupo ácido aminoetiloxi-etiloxi-acético (Aeea) en el extremo C-terminal (SP-347) o en el extremo N-terminal (SP-350) o en ambos extremos terminales (SP-343). Se mide la síntesis de GMP cíclico en células T84 mediante el método descrito anteriormente.

Los péptidos SP-347 y SP-350 mostraron potencias comparables a SP-333 en sus capacidades para estimular la síntesis de GMPc en células T84. Sin embargo, el péptido SP-343 era considerablemente menos potente en comparación con los otros péptidos sometidos a prueba. La escasa actividad de SP-343 podría deberse al considerable impedimento estérico producido por los grupos Aeea grandes en ambos extremos terminales.

#### Ejemplo 6: Combinación de agonistas de receptores de guanilato ciclasa con inhibidores de fosfodiesterasa

La regulación de las concentraciones intracelulares de nucleótidos cíclicos (es decir, AMPc y GMPc) y, por tanto, la señalización a través de estos segundos mensajeros, generalmente se ha considerado que se rige por sus tasas de producción frente a sus tasas de destrucción dentro de las células. Por lo tanto, los niveles de GMPc en tejidos y órganos también pueden regularse por los niveles de expresión de fosfodiesterasas específicas de GMPc (GMPc-PDE), que generalmente están sobreexpresadas en cáncer y enfermedades inflamatorias. Por tanto, una combinación que consiste en un agonista de GCC con un inhibidor de GMPc-PDE podría producir un efecto sinérgico sobre los niveles de GMPc en los tejidos y órganos diana.

Sulindac sulfona (SS) y zaprinast (ZAP) son dos de los inhibidores conocidos de GMPc-PDE y se ha mostrado que inducen apoptosis en células cancerosas por medio de un mecanismo dependiente de GMPc. Se evaluaron SS y ZAP en combinación con SP-304 o SP-333 para ver si estos inhibidores de PDE tenían algún efecto sinérgico sobre la acumulación intracelular de GMPc (figuras 9-12). Tal como muestran los datos, SS a una concentración de 100 µM no potenció la acumulación intracelular de GMPc. Sin embargo, la combinación de SS con SP-304 estimuló

la producción de GMPc varias veces más que la estimulación por SP-304 solo. Este efecto sinérgico sobre los niveles de GMPc fue más pronunciado cuando se usó SP-304 a una concentración de 0,1  $\mu$ M (figura 10). Se hicieron observaciones similares cuando se usaron SP-304 o SP-333 en combinación con ZAP (figura 10, figura 11 y figura 12). Estos resultados sugieren que los niveles intracelulares de GMPc se estabilizan porque SS inhibe GMPc-PDE que podría ser responsable del agotamiento de GMPc intracelular. Por tanto, el enfoque de usar una combinación de agonista de GCC con un inhibidor de GMPc-PDE es atractivo.

Para los resultados mostrados en la figura 9, se evaluó la síntesis de GMP cíclico en células T84 esencialmente tal como se describe en Shailubhai *et al.*, Cancer Research 60, 5151-5157 (2000). En resumen, se lavaron dos veces monocapas confluentes de células T-84 en placas de 24 pocillos con 250  $\mu$ l de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) y se preincubaron a 37°C durante 10 minutos con 250  $\mu$ l de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) e isobutilmetilxantina 1 mM (IBMX). Entonces se incubaron monocapas de células T84 con 250  $\mu$ l de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) que contenía SP-304 o inhibidores de PDE o bien solos o bien en combinaciones, tal como se indica a continuación en los siguientes conjuntos experimentales: 1) Control; 2) SP-304 (0,1  $\mu$ M); 3) sulindac sulfona (100  $\mu$ M); 4) Zaprinast (100  $\mu$ M); 5) SP-304 (0,1  $\mu$ M) + sulindac sulfona (100  $\mu$ M); y 6) SP-304 (0,1  $\mu$ M) + zaprinast (100  $\mu$ M). Tras la incubación de 30 min, se aspiró el medio y se terminó la reacción mediante la adición de ácido perclórico al 3%. Tras la centrifugación y la adición de NaOH (0,1 N) para neutralizar el pH, se determinaron los niveles de GMPc intracelulares en lisados usando un kit de ELISA de GMPc (n.º de cat. 581021; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Se realizaron las incubaciones por duplicado, y se ejecutó cada muestra por duplicado usando la prueba de ELISA.

Para los resultados mostrados en la figura 10, el método usado fue el mismo que el usado para la figura 9 excepto porque se incubaron las monocapas de células T84 con 500  $\mu$ l de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) que contenía SP-304 (0,1 ó 1,0  $\mu$ M) o concentraciones crecientes de inhibidores de PDE (de 0 a 750  $\mu$ M) o bien solos o bien en combinación con SP-304. Tras la incubación de 30 min, se aspiró el medio y se terminó la reacción mediante la adición de ácido perclórico al 3%. Tras la centrifugación y la adición de NaOH (0,1 N) para neutralizar el pH, se determinaron los niveles de GMPc intracelulares en lisados usando un kit de ELISA de GMPc (n.º de cat. 581021; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Se ejecutaron muestras por triplicado usando la prueba de ELISA.

Para los resultados mostrados en la figura 11, el método usado fue el mismo que el usado para la figura 10 excepto porque se incubaron las monocapas de células T84 con 500  $\mu$ l de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) que contenía SP-3333 (0,1 ó 1,0  $\mu$ M) o concentraciones crecientes de ZAP (de 0 a 500  $\mu$ M) o bien solo o bien en combinación con SP-333. Tras la incubación de 30 min, se aspiró el medio y se terminó la reacción mediante la adición de ácido perclórico al 3%. Tras la centrifugación y la adición de NaOH (0,1 N) para neutralizar el pH, se determinaron los niveles de GMPc intracelulares en lisados usando un kit de ELISA de GMPc (n.º de cat. 581021; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Se ejecutaron muestras por triplicado usando la prueba de ELISA.

Para los resultados mostrados en la figura 12, el método usado fue el mismo que el usado para la figura 10 excepto porque se incubaron las monocapas de células T84 con 500  $\mu$ l de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) que contenía SP-333 (0,1  $\mu$ M) o concentraciones crecientes de sulindac sulfona (de 0 a 500  $\mu$ M) o bien sola o bien en combinación con SP-333. Tras la incubación de 30 min, se aspiró el medio y se terminó la reacción mediante la adición de ácido perclórico al 3%. Tras la centrifugación y la adición de NaOH (0,1 N) para neutralizar el pH, se determinaron los niveles de GMPc intracelulares en lisados usando un kit de ELISA de GMPc (n.º de cat. 581021; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Se ejecutaron muestras por triplicado usando la prueba de ELISA.

#### **Ejemplo 7: Un estudio de toxicidad de dosis oral repetida de SP-304 en monos cynomolgus.**

El principal fin de este experimento era evaluar la toxicidad y farmacocinética de una dosis oral repetida de SP-304 en monos cynomolgus. El tratamiento con una dosis diaria de 250 mg de SP-304 durante 14 días consecutivos se toleró bien por todos los monos, sin embargo el tratamiento produjo de manera sistemática heces líquidas y diarrea acuosa (figura 14). Monos regresaron a una consistencia normal de las deposiciones en el plazo de 24-48 horas tras la última dosis de SP-304.

#### **Ejemplo 8: El tratamiento con SP-304 mejora la consistencia de las deposiciones y elimina el bloqueo intestinal inducido por TNBS en un modelo de colitis murina inducida por TNBS.**

SP-304 es un análogo superior de uroguanilina y un agonista de GCC. La administración anal de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) se usa normalmente para producir bloqueo intestinal, dando como resultado una mala consistencia de las deposiciones. Tal como se muestra en la figura 13, la administración oral de SP-304 mejoró considerablemente la consistencia de las deposiciones en ratones tratados con TNBS. El tratamiento con SP-304 a una dosis de entre 0,05 y 0,5 mg/kg de peso corporal fue suficiente para restaurar completamente la puntuación de consistencia hasta el nivel observado en ratones tratados con tampón fosfato en lugar de TNBS (control sin TNBS). Sulfasalazina, un fármaco aprobado por la FDA usado como control positivo, también restauró la consistencia normal de las deposiciones.

**Ejemplo 9: Un estudio de seguridad, tolerabilidad y farmacocinético aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, de dosis única, creciente, oral de SP-304 en voluntarios masculinos y femeninos humanos adultos sanos**

- 5 Los objetivos de este estudio fueron evaluar la seguridad y farmacocinética de una dosis oral única de SP-304 en sujetos sanos. Éste era un estudio de escalada de la dosis de fase 1, de sitio único, aleatorizado, de doble ciego, controlado por placebo, de dosis única, creciente, oral, secuencial de SP-304 en sujetos masculinos y femeninos sanos, en ayunas. Se utilizaron un total de 9 cohortes que utilizaban 8 sujetos por cohorte (6 SP-304; 2 placebo), totalizando 71 voluntarios a los que se les administró el fármaco (un voluntario abandonó). A cada cohorte se le administró una dosis oral única o placebo coincidente administrado en solución salina tamponada con fosfato diluida 10 veces (PBS) (240 ml). A los sujetos se les administró sólo una dosis de tratamiento en estudio y no pudieron incluirse en cohortes posteriores. Las dosis de las nueve cohortes incluían 0,1, 0,3, 0,9, 2,7, 5,4, 8,1, 16,2, 24,3 mg y 48,6 mg de SP-304.
- 10
- 15 Dosis de SP-304
- 0,1 mg (6 activos, 2 placebos)
- 0,3 mg (6 activos, 2 placebos)
- 20 0,9 mg (6 activos, 2 placebos)
- 2,7 mg (6 activos, 2 placebos)
- 25 5,4 mg (6 activos, 2 placebos)
- 8,1 mg (6 activos, 2 placebos)
- 16,2 mg (5 activos, 2 placebos)
- 30 24,3 mg (6 activos, 2 placebos)
- 48,6 mg (6 activos, 2 placebos)
- 35 La decisión de avanzar a la siguiente cohorte la tomaron el promotor del estudio e investigador principal tras la revisión de la información de seguridad, ciega preliminar de la cohorte. Se revisaron todos los datos de seguridad recogidos a lo largo de las 48 horas tras la dosificación para evaluar la tolerabilidad del nivel de dosis. Se requería un mínimo de 3 sujetos evaluables para la determinación de la seguridad y tolerabilidad a cada nivel de dosis.
- 40 Los criterios de interrupción fueron: 1) acontecimientos adversos clínicamente significativos [incluyendo cambios significativos en parámetros de laboratorio o electrocardiograma (ECG)] en  $\geq 4$  sujetos (conjuntamente dentro de una cohorte), o 2) 1 acontecimiento adverso grave (SAE) relacionado con el fármaco. No se administraron dosis superiores si uno de estos criterios no se cumplía. De lo contrario, el estudio podía avanzar a la siguiente cohorte de dosis superior.
- 45 Se monitorizó la seguridad mediante exámenes físicos, signos vitales, pruebas de laboratorio clínico (hematología, química, análisis de orina, sangre oculta fecal), ECG, y evaluaciones de experiencias adversas). Se recogieron muestras de sangre en serie 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 16, 24, 36 y 48 horas tras la dosificación. Se sometieron a ensayo muestras de plasma mediante un método validado para SP-304, y se calcularon parámetros farmacocinéticos. Los criterios de valoración farmacodinámicos que se evaluaron incluyeron el tiempo hasta la primera deposición, frecuencia de deposiciones (periodo de 48 horas) y consistencia de las deposiciones (periodo de 48 horas) usando la escala de forma de las deposiciones de Bristol (BSFS).
- 50 El estudio de fase 1 (protocolo n.º SP-SP304101-08) usó una disolución oral preparada por un farmacéutico autorizado registrado en el sitio de investigación no más de una hora antes de la administración de la dosis.
- 55 Los objetivos primarios de esta evaluación clínica fueron determinar la seguridad, toxicidad y absorción sistémica de a una dosis oral única de SP-304. Los datos indicaron que SP-304 se toleraba bien a todos los niveles de dosificación y no había ningún acontecimiento adverso grave (SAE). El acontecimiento adverso (AE) más prevalente observado durante este estudio fue diarrea de grado I (12,7%), tal como se define usando los criterios de terminología común para acontecimientos adversos (CTCAE), que es un aumento en el número de movimientos intestinales desde 1 y  $< 4$  en un periodo de 24 horas. De manera notable, se esperaba que SP-304 promoviera el movimiento intestinal, por tanto se consideró que el aumento en el número de movimientos intestinales estaba relacionado con la acción farmacodinámica (PD) de SP-304.
- 60
- 65 El efecto de una dosis oral única de SP-304 sobre consistencia de las deposiciones, tal como se evalúa mediante la

escala de forma de las deposiciones de Bristol (BSFS), también se examinó en los voluntarios. La puntuación de BSFS para los siete tipos de deposiciones es:

- 5 • Tipo 1: Trozos duros separados, como nueces (difíciles de excretar)
- Tipo 2: Con forma de salchicha, pero con grupos
- Tipo 3: Como una salchicha pero con grietas en su superficie
- 10 • Tipo 4: Como una salchicha o culebra, lisa y blanda
- Tipo 5: Pedazos blandos con bordes definidos (se excreta fácilmente)
- Tipo 6: Trozos esponjosos con bordes deshechos, una deposición pastosa
- 15 • Tipo 7: Completamente líquida

Los tipos 1 y 2 indican estreñimiento, siendo con 3 y 4 las "deposiciones ideales" especialmente la última, ya que son las más fáciles de excretar, y las puntuaciones 5-7 indican una tendencia adicional hacia diarrea o apremio.

20 Las figuras 15A-B muestran el efecto de una única dosis de SP-304 o placebo sobre la puntuación de BSFS en voluntarios tratados con SP-304 que oscilaba entre una dosis de 0,1 mg y un máximo de 48,6 mg. Los datos indican que el tratamiento con SP-304 produjo un aumento en la puntuación de BSFS en los voluntarios, en relación con los voluntarios tratados con placebo, lo que refleja un cambio en la consistencia de las deposiciones hacia un movimiento intestinal más suelto en voluntarios tratados con SP-304. Estos resultados indican que SP-304 tiene el potencial de normalizar el movimiento intestinal y aliviar las molestias debidas a estreñimiento crónico.

30 La figura 16 muestra el efecto de una única dosis de SP-304 o placebo sobre el tiempo hasta la primera deposición en el periodo de 24 horas tras la dosificación. Los datos indican que el tratamiento con SP-304 disminuyó significativamente el tiempo hasta el primer movimiento intestinal desde 10,6 horas en voluntarios tratados con placebo hasta de aproximadamente 3 a 6 horas, tras el tratamiento con SP-304 a dosis que oscilaban entre 2,7 y 48,6 mg.

#### 35 **Ejemplo 10: SP-304 mejora la inflamación en colitis inducida por DSS en ratones BDF-1.**

La ruta de GMPc media en los efectos antiinflamatorios de moléculas celulares tales como óxido nítrico y hemo oxigenasa-1. Las terapias que inducen GMPc (inhibidores de fosfodiesterasa-4) han demostrado eficacia en modelos murinos de IBD. Se evaluaron los efectos antiinflamatorios del agonista de GCC SP-304 en un modelo murino de colitis ulcerosa, el modelo de colitis inducida por DSS.

40 Se dividieron cuarenta y ocho ratones BDF1 en 8 grupos de tratamiento (6 ratones/grupo). Un grupo no se expuso a DSS (control no tratado) y los grupos 2-10 se trataron con DSS al 5% en el agua potable. Se renovó diariamente DSS. Se pesaron todos los ratones en el día -1, y se trataron con los materiales de prueba comenzando en el día -1. 4 h tras la dosificación en el día 0, se puso DSS en el agua potable de los grupos 2-8 y permaneció DSS en el agua hasta el final del estudio. Se administraron los agentes de prueba a las 9 a.m. diariamente hasta el día 7. Se trataron los animales con una única dosis de agentes de prueba y los grupos fueron los siguientes:

- 45 1. Sin exposición a DSS - sonda nasogástrica de PBS (control sin DSS)
- 50 2. DSS al 5% + PBS (control de vehículo)
3. DSS al 5% + sulfasalazina 80 mg/kg (control positivo)
4. DSS al 5% + SP-304 0,005 mg/kg
- 55 5. DSS al 5% + SP-304 0,05 mg/kg
6. DSS al 5% + SP-304 0,5 mg/kg
- 60 7. DSS al 5% + SP-304 2,5 mg/kg
8. DSS al 5% + SP-304 50 mg/kg

65 Se administraron todas las dosis mediante sonda nasogástrica oral usando una dosis de 0,1 ml por 10 g de peso corporal. Para evitar la variación de jaula a jaula, se alojaron diferentes grupos de tratamiento en la misma jaula y se les realizó a los animales una punción en la oreja para fines de identificación. Se sacrificaron los ratones en el día 7,

4-6 h tras la última dosificación. Se sometieron los animales también a examen interno de los órganos principales para detectar cualquier anomalía macroscópica. Se retiró la sección distal del intestino grueso (suficiente para el examen histopatológico) y se fijó en disolución de Carnoy y se incrustó en parafina. Se cortaron dos secciones que no estaban en serie por portaobjetos y se tiñeron con H&E para el análisis de puntuación de gravedad visual. Se puntuaron todos los portaobjetos de una manera ciega.

Puntuación de histopatología

0	normal
1	quedan todas las criptas pero con aspecto anómalo, todo el músculo intacto
2	quedan menos del 90% de las criptas, todo el músculo intacto
3	quedan menos del 75% de las criptas, la mayoría del músculo intacto
4	quedan menos del 10% de las criptas, la mayoría del músculo degradado
5	no quedan criptas, músculo degradado

Se examinaron cinco secciones diferentes del tejido para la puntuación histopatológica y se calculó el promedio de las puntuaciones para cada ratón. Las puntuaciones de histopatología en la figura 17 se expresan como un promedio de 6 ratones. Tal como se muestra en la figura 17, los datos indican que el tratamiento de ratones con DSS produjo inflamación leve en el intestino grueso. Tal como se esperaba, la gravedad de la inflamación se redujo considerablemente en ratones tratados con sulfasalazina. De manera similar, ratones tratados con dosis de SP-304 que oscilaban entre 0,005 y 5 mg/kg/peso corporal también mostraron inflamación reducida en el tejido del colon. Estos resultados indican que la administración oral con SP-304 mejoró la inflamación inducida por DSS en el tejido del colon. El tratamiento con SP-304 no cambió el peso del colon considerablemente.

**Ejemplo 11: SP-304 mejora la inflamación en colitis inducida por TNBS en ratones BDF-1**

La administración anal de TNBS se usa ampliamente para inducir inflamación en el colon de ratones y ratas. La colitis ulcerosa inducida por TNBS es un modelo comúnmente usado para colitis experimental en ratones para la evaluación de fármacos que van a usarse para el tratamiento de IBD en seres humanos. Para evaluar los efectos antiinflamatorios del agonista de GCC SP-304, se dividieron aleatoriamente noventa ratones BDF-1 en 9 grupos de 10 cada uno tal como sigue:

1. Sin exposición a TNBS - sonda nasogástrica de PBS (control sin TNBS)
2. TNBS + PBS (control de vehículo)
3. TNBS + sulfasalazina 80 mg/kg (control positivo)
4. TNBS + SP-304 0,0005 mg/kg
5. TNBS + SP-304 0,005 mg/kg
6. TNBS + SP-304 0,05 mg/kg
7. TNBS + SP-304 0,5 mg/kg
8. TNBS + SP-304 2,5 mg/kg
9. TNBS + SP-304 50 mg/kg

A los grupos 2-9 se les administraron 2,5 mg de TNBS en etanol al 50% a través de la ruta anal usando un catéter de caucho en el día 0. A los ratones se les administró una única dosis de SP-304 a las 9 a.m. cada día durante siete días. Al final del estudio se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical. Se retiró el intestino grueso distal y se fijó en fijador de Carnoy. Se incrustaron las muestras en parafina y se contaron dos secciones que no estaban en serie por muestra y se montaron sobre un portaobjetos antes de la tinción con H&E. Se puntuaron los portaobjetos de tejidos intestinales. Se observaron microscópicamente secciones histológicas ciegas y se les asignó una puntuación de gravedad de 0 a 5, según el sistema de puntuación descrito en la figura 8. Para cada ratón se evaluaron 5 zonas de sección transversal del intestino grueso. Los resultados se expresan como un promedio. Tal como se muestra en la figura 18, el tratamiento con SP-304 a una dosis de tan sólo 0,05 mg/kg de peso corporal redujo significativamente la inflamación colónica. De manera interesante, la potencia de SP-304 incluso a concentraciones de tan sólo 0,05 mg/kg era comparable a sulfasalazina administrada a una dosis de 80 mg/kg de peso corporal.

**Ejemplo 12: La dosis diaria repetida de SP-304 produjo diarrea grave en monos cynomolgus**

Se les administró a monos macho (n=4) y hembra (n=4) una dosis diaria (1 ó 10 ó 75 mg/kg de peso corporal) de

SP-304 repetidamente durante 28 días. Se registró el efecto del tratamiento sobre la consistencia de las deposiciones tres veces al día. Tal como se muestra en la figura 19, el tratamiento oral con SP-304 produjo diarrea/deposiciones líquidas en ambos sexos. Sin embargo, los monos hembra mostraron un efecto más pronunciado. En hembras, una dosis de 10 mg/kg de peso corporal produjo diarrea grave de manera sistemática. Por tanto, se usó SP-304 a 10 mg/kg de peso corporal en los experimentos posteriores. Se obtuvieron resultados similares con SP-333.

#### **Ejemplo 13: La dosis repetida de SP-304 produjo meteorismo grave en el intestino proximal en ratones**

El objetivo de este experimento era determinar el sitio de acción primario para SP-304 administrado por vía oral con respecto a su capacidad para estimular la secreción de agua en el tracto gastrointestinal. En circunstancias fisiológicas normales, la secreción de agua se produce principalmente en el duodeno y el agua secretada se reabsorbe entonces en el íleon. Se les administró a ratones (hembra, n=6; macho, n=6) una única dosis de SP-304 mediante sonda nasogástrica oral y se sacrificaron 30 minutos después. Se examinó el tracto gastrointestinal para detectar signos de meteorismo, que indica una secreción de agua excesiva. Tal como se muestra en la tabla VIII, SP-304 produjo meteorismo sólo en el estómago y en el intestino proximal (duodeno y yeyuno) pero no en el ciego o intestino distal (íleon y colon). Estos resultados demuestran que SP-304 administrado por vía oral provocó secreción de agua en el duodeno/yeyuno. Por tanto, el sitio de acción de SP-304 es principalmente en las partes de duodeno y yeyuno del tracto gastrointestinal.

Tabla VIII: La administración oral de SP-304 produjo meteorismo grave en el intestino proximal de ratones. Se les administró a ratones (6 machos y 6 hembras) por vía oral SP-304 (1200 mg/kg de peso corporal). Tras 30 minutos, se sacrificaron los ratones y se abrieron inmediatamente para determinar si la administración de SP-304 había provocado meteorismo, debido a una secreción excesiva de fluido, en diferentes segmentos del tracto GI. Los resultados se expresan como % del número de ratones que muestran meteorismo en diversas partes del tracto GI.

Segmento del tracto GI	Número de ratones macho de animales con meteorismo (% del total) n=6	Número de ratones hembra de animales con meteorismo (% del total) n=6
Estómago	3(50%)	2(33%)
Duodeno	2(33%)	2(33%)
Yeyuno	6(100%)	6(100%)
Ciego	1(2%)	0(0%)

#### **Ejemplo 14: Formulaciones de SP-304 para diferentes enfermedades del GI**

Tal como se indica mediante los datos en la tabla VIII, SP-304 administrado por vía oral actúa en las partes proximales del tracto GI (duodeno, yeyuno) estimulando la secreción de agua. Por tanto, una formulación para la administración de SP-304 a esta región debe demostrar una eficacia mejorada para el tratamiento de estreñimiento crónico, IBS-C y otras enfermedades del intestino proximal. Esto se debe a que una formulación de este tipo estimularía más eficazmente la secreción de agua y promovería la normalización del movimiento intestinal en pacientes que padecen estos estados. Además, la agregación de SP-304, que se produce comenzando a 1,0 mg/ml y se promueve por condiciones ácidas, se minimizaría en una formulación de liberación dependiente del pH diseñada para liberar a pH superior. Por tanto, una formulación de liberación dependiente del pH de SP-304 que comprende el polímero Eudragit se sometió a prueba para determinar la eficacia de liberación a pH mayor de 5,5, lo que dirigiría la liberación al duodeno. Tal como se muestra en la figura 20, cápsulas de gelatina recubiertas con polímero Eudragit para disolución a pH mayor de 5,5 no se desintegraron y SP-304 no se liberó en condiciones ácidas a pH 1 ó 2,5. Tal como se esperaba, la incubación de la cápsula a pH 5,7 liberó SP-304 en el plazo de 20 minutos y en el plazo de 60 minutos la mayor parte del péptido se liberó. El SP-304 liberado era biológicamente activo tal como se determinó en el bioensayo de células T84 (véase la figura 21).

Para el tratamiento de IBD y otras enfermedades o trastornos del tracto GI distal, es ventajoso desarrollar una formulación que dirige los agonistas de GCC al tracto GI distal, particularmente el íleon terminal. Éste es particularmente el caso del tratamiento de IBD que a menudo se complica con diarrea. Por tanto, la administración oral de un agonista de GCC probablemente sería contraproducente para IBD debido a la estimulación de la secreción de agua en el duodeno. Este problema se evitaría mediante una formulación que dirige la administración al íleon terminal. Por tanto se sometió a prueba una formulación de liberación dependiente del pH de SP-304 para determinar la eficacia de liberación a pH mayor de 7, lo que dirigiría la liberación al íleon terminal. Tal como se muestra en la figuras 20 y 21, la formulación de polímero Eudragit liberó el SP-304 a pH 7,2 y el SP-304 liberado era biológicamente activo.

#### **Ejemplo 15: SP-304 y SP-333 formulados en recubrimiento con polímero Eudragit para la administración a o por encima de pH 7 minimizó la diarrea en monos cynomolgus**

Tal como se muestra en la figura 22, SP-304 formulado en cápsulas de gelatina recubiertas con polímero Eudragit

5 (para disolución a pH por encima de 7) produjo considerablemente menos incidencias de diarrea en comparación con las cápsulas no recubiertas que contenían la misma dosis de SP-304 (10 mg/kg de peso corporal). Estos resultados demuestran que la administración de un agonista de GCC al intestino distal reduce la incidencia de diarrea que de lo contrario se esperaría de una administración oral del agonista. Por tanto, se preferiría una formulación de este tipo para el tratamiento de IBD, cáncer de colon y otras enfermedades del intestino distal.

10 SP-333 es un agonista de GCC que se diseñó para lograr una estabilidad aumentada frente a la proteólisis que normalmente se produciría en el fluido intestinal. Por tanto, este péptido también sería útil para el tratamiento de IBD, cáncer de colon y otras enfermedades del intestino distal. Se formuló SP-333 en cápsulas de gelatina recubiertas con polímero Eudragit para disolución a pH por encima de 7. Tal como se muestra en la figura 23, las cápsulas recubiertas produjeron una incidencia de diarrea considerablemente inferior en comparación con las cápsulas no recubiertas.

## REIVINDICACIONES

1. Formulación de agonista de GCC para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno gastrointestinal en un sujeto que lo necesita que comprende:
- 5
- (1) un núcleo, que contiene al menos un péptido agonista de GCC seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-44 y 99-107; y o bien
- (2)(i) uno o más polímeros dependientes del pH que se degradan en un intervalo de pH de 4,5 a 5,5, en la que la formulación está optimizada para la administración del agonista de GCC al duodeno o yeyuno, o bien
- 10
- (2)(ii) uno o más polímeros dependientes del pH que se degradan en un intervalo de pH de 5,5 a 6,5 o en un intervalo de pH de 6,5 a 7,5, en la que la formulación está optimizada para la administración del agonista de GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente; y opcionalmente
- 15
- (3) un polímero hinchable, y/o una composición degradable
- en la que cuando la formulación está optimizada para la administración del agonista de GCC al duodeno o yeyuno la enfermedad o trastorno gastrointestinal se selecciona de síndrome del intestino irritable, dispepsia no ulcerosa, pseudoobstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudoobstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico, estreñimiento idiopático crónico, gastroparesia, pirosis, cáncer gástrico e infección por *H. pylori*, y cuando la formulación está optimizada para la administración del agonista de GCC al íleon, íleon terminal o colon ascendente la enfermedad o trastorno gastrointestinal se selecciona de ileítis (ileítis posoperatoria), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, ileítis terminal y cáncer de colon.
- 20
2. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 1, en la que el péptido agonista de GCC se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y 9.
- 30
3. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 1, en la que la formulación es para una vía de administración oral.
4. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 1, en la que el polímero dependiente del pH se selecciona del grupo que consiste en un copolímero de ácido metacrílico, un poli(acetato-ftalato de vinilo), un ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, un acetato-trimelitato de celulosa, un acetato-ftalato de celulosa o un acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, preferiblemente un copolímero de ácido metacrílico, preferiblemente seleccionado de entre los polímeros EUDRAGIT, y lo más preferiblemente seleccionado de entre el grupo que consiste en EUDRAGIT L100, EUDRAGIT L-30D, EUDRAGIT S100, EUDRAGIT FS 30D y EUDRAGIT L100-55, y combinaciones de los mismos.
- 35
- 40
5. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 1, en la que la formulación comprende uno o más polímeros dependientes del pH y un polímero hinchable.
- 45
6. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 5, en la que la formulación comprende dos polímeros dependientes del pH que se degradan en un intervalo de pH de 6,5 a 7,5 y en la que el polímero hinchable forma una capa entre los dos polímeros dependientes del pH.
7. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 5, en la que el polímero hinchable se selecciona del grupo que consiste en un copolímero acrílico, poli(acetato de vinilo) y derivados de celulosa, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en EUDRAGIT RL, EUDRAGIT RS y EUDRAGIT NE.
- 50
8. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 5, que comprende además un agente de formación de poros, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, cloruro de sodio, cloruro de potasio, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, ácidos orgánicos solubles en agua, azúcares y alcohol de azúcar.
- 55
9. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 1, en la que la formulación comprende una composición degradable, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en amilasa, quitosano, sulfato de condroitina, ciclodextrina, dextrano, goma guar, pectina y xilano.
- 60
10. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 9, que comprende además un material seleccionado del grupo que consiste en acetato-ftalato de celulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, EUDRAGIT L100 y EUDRAGIT L30D-55, en la que el material forma un recubrimiento externo sobre la composición degradable.
- 65

11. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 9, en la que la composición degradable es una molécula portadora unida al agonista de GCC mediante un enlace covalente, preferiblemente un enlace azo o un enlace glicosídico, en la que el enlace covalente es estable en el estómago e intestino delgado pero lábil en el tracto gastrointestinal inferior, especialmente el colon.
- 5
12. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 11, en la que la molécula portadora se selecciona del grupo que consiste en un glucurónido, una ciclodextrina, un éster de dextrano o un aminoácido polar.
- 10
13. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 1, en la que al sujeto se le administra un agente adicional seleccionado de
- 15
- (i) una cantidad eficaz de un inhibidor de una fosfodiesterasa específica de GMPc, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en sildinac sulfona, zaprinast, y motapizona, vardenifilo y suldenifilo
- (ii) una cantidad eficaz de al menos un laxante, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en SENNA, MIRALAX, PEG o policarbofilo de calcio
- 20
- (iii) una cantidad eficaz de al menos un agente antiinflamatorio.
14. Formulación de agonista de GCC para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto es un ser humano.

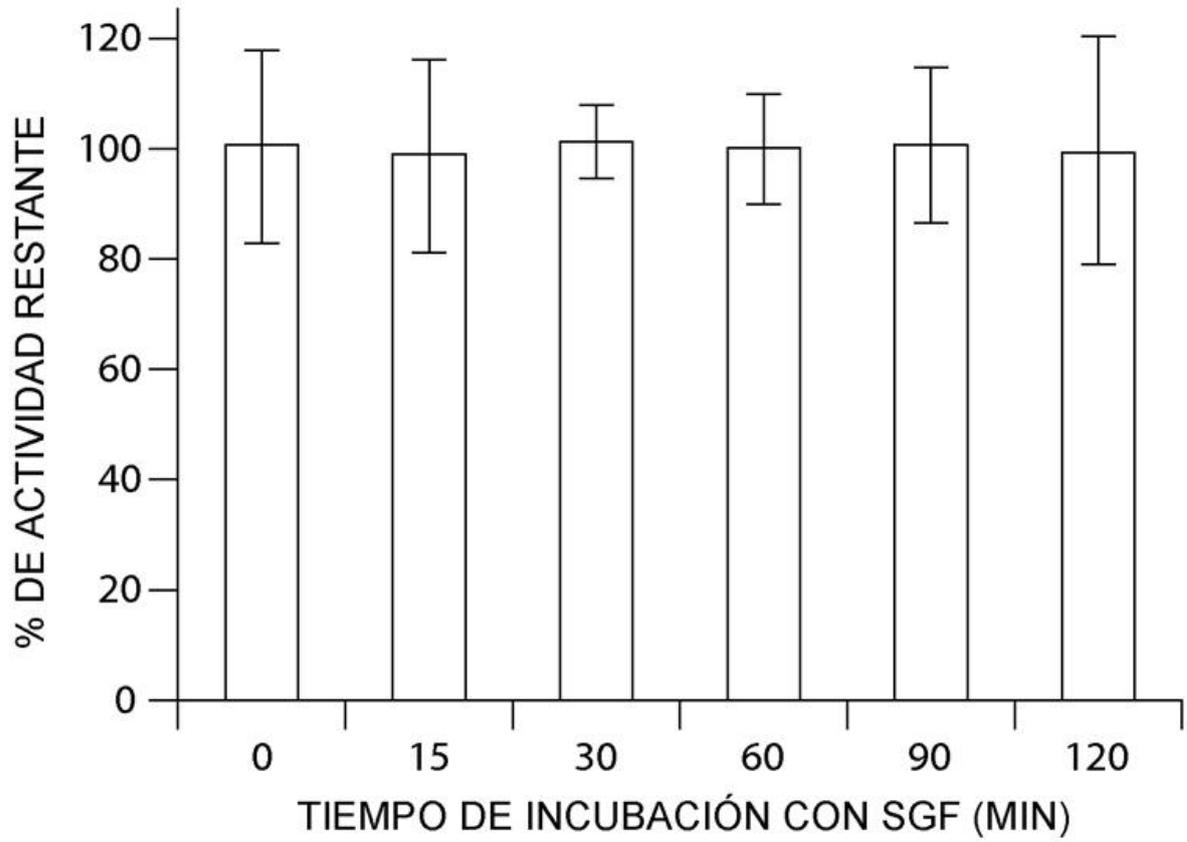


Fig. 1A

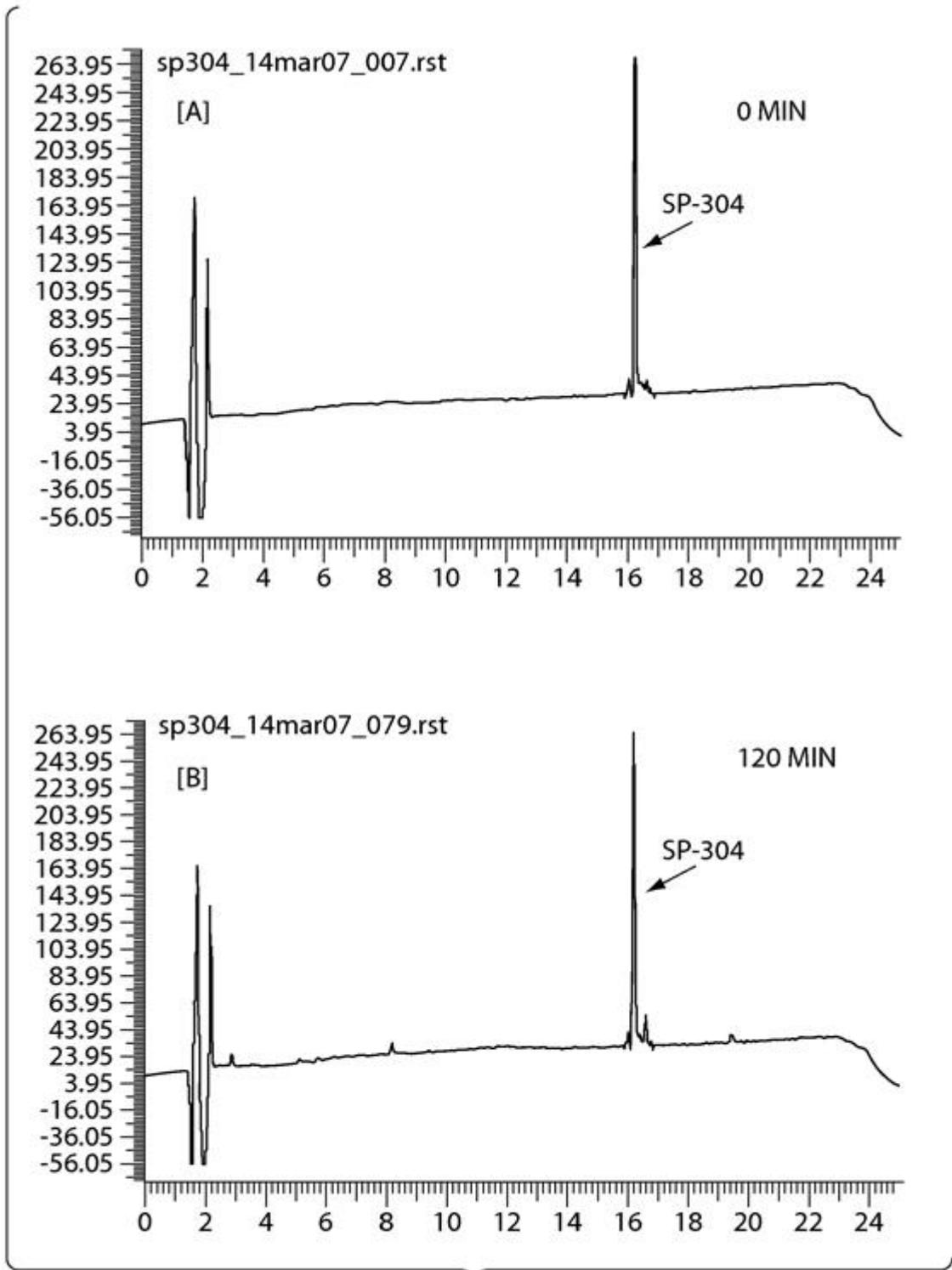
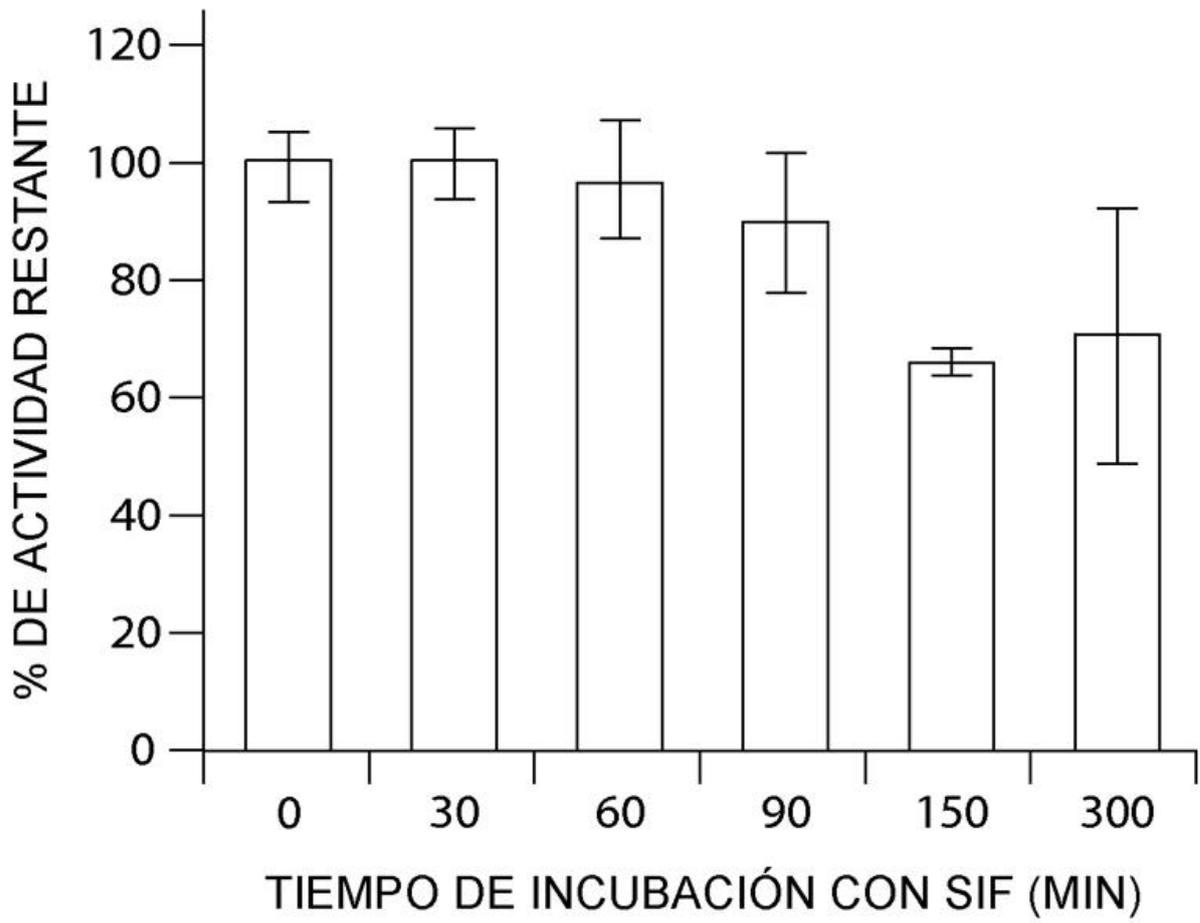


Fig. 1B



**Fig. 2A**

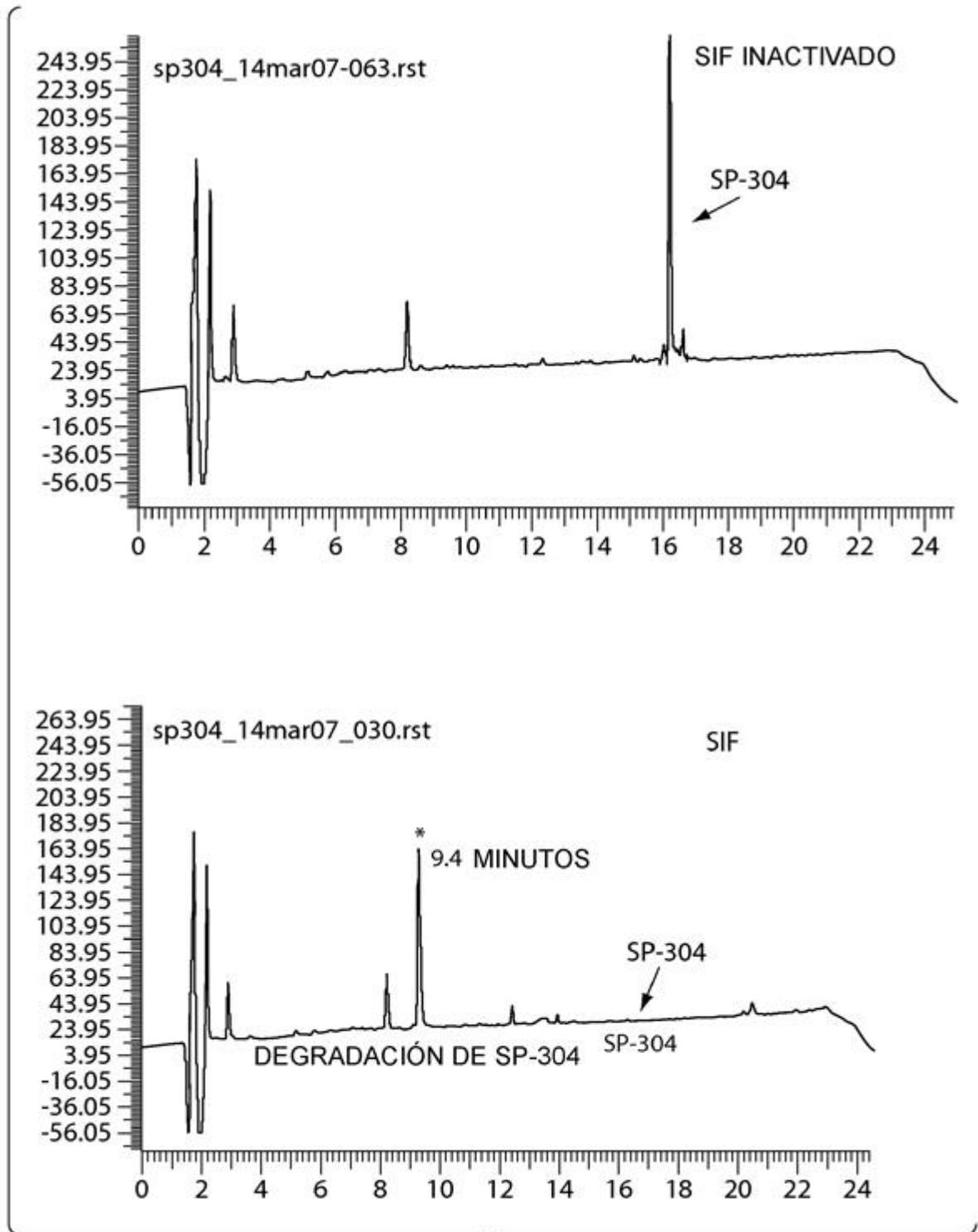


Fig. 2B

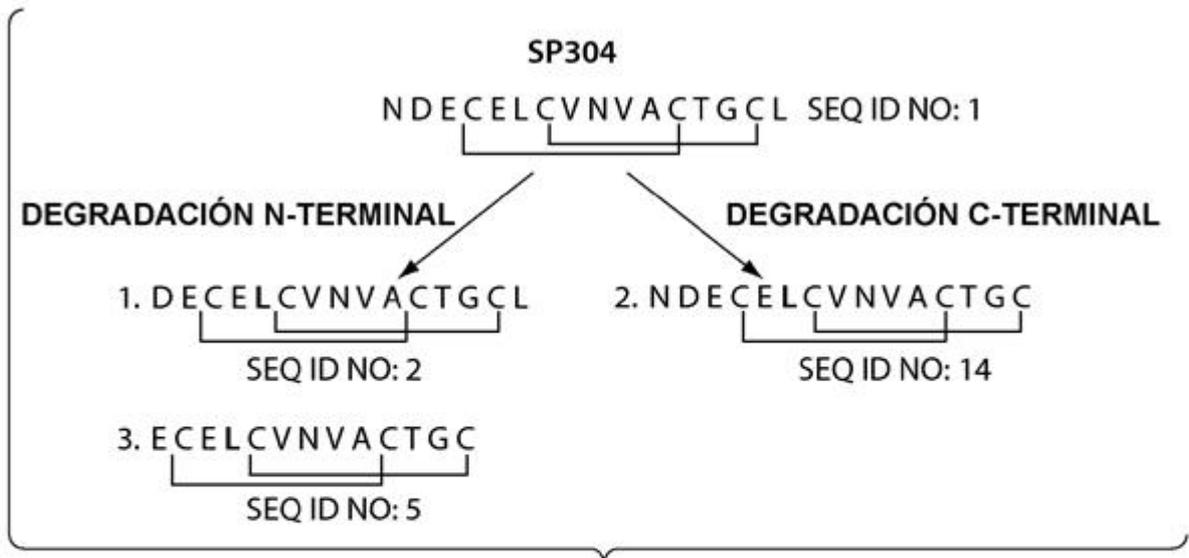


Fig. 3

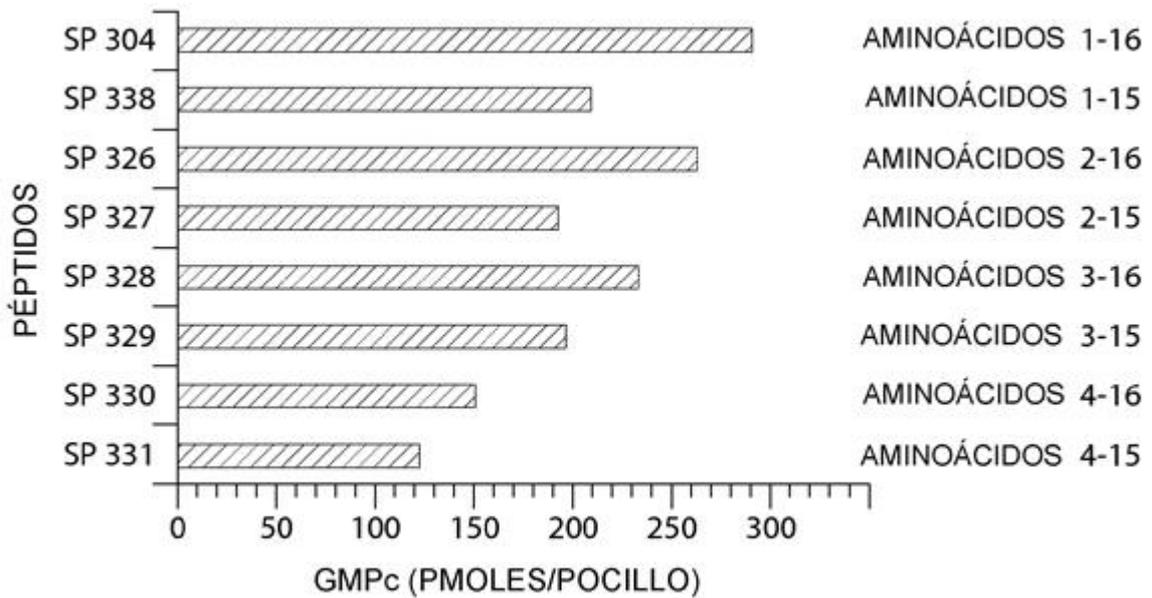


Fig. 4

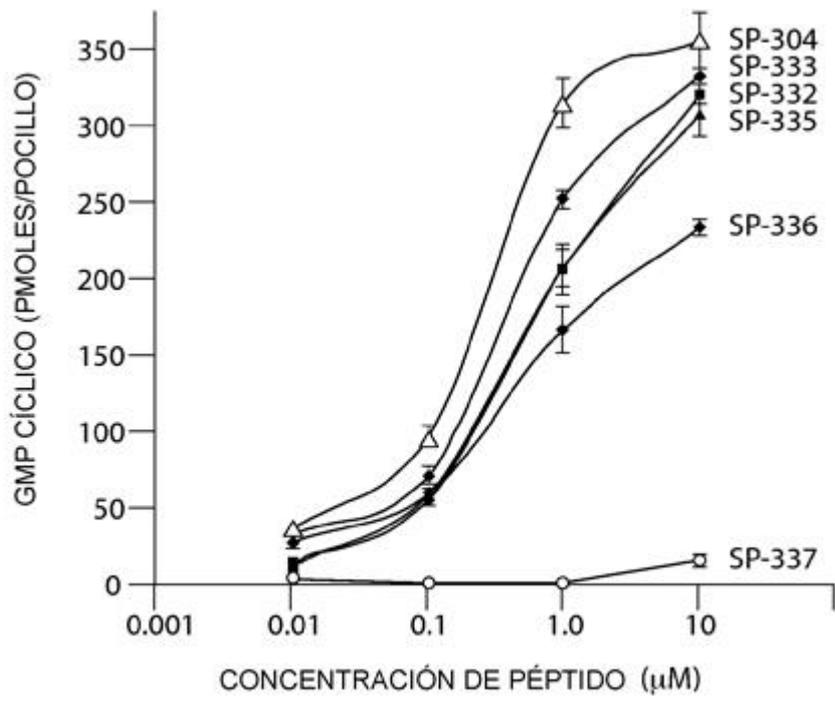


Fig. 5

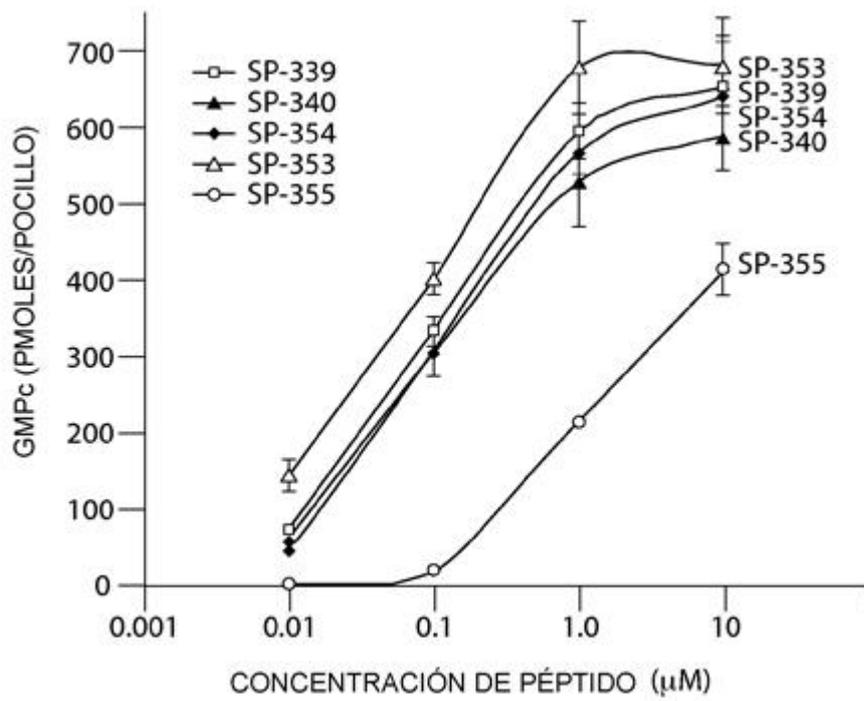


Fig. 6

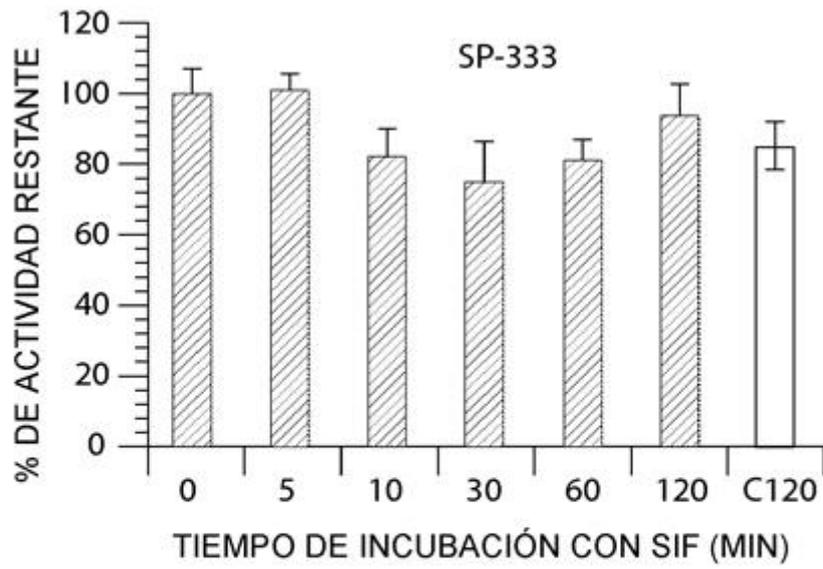


Fig. 7A

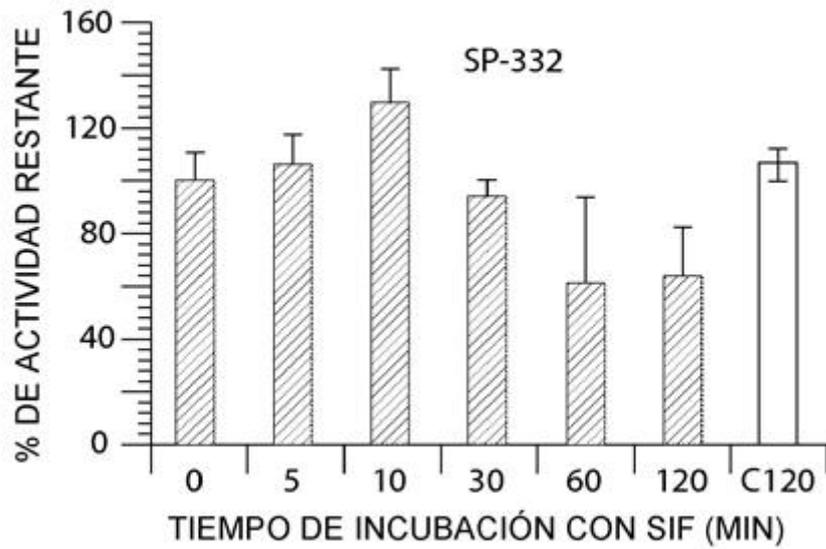


Fig. 7B

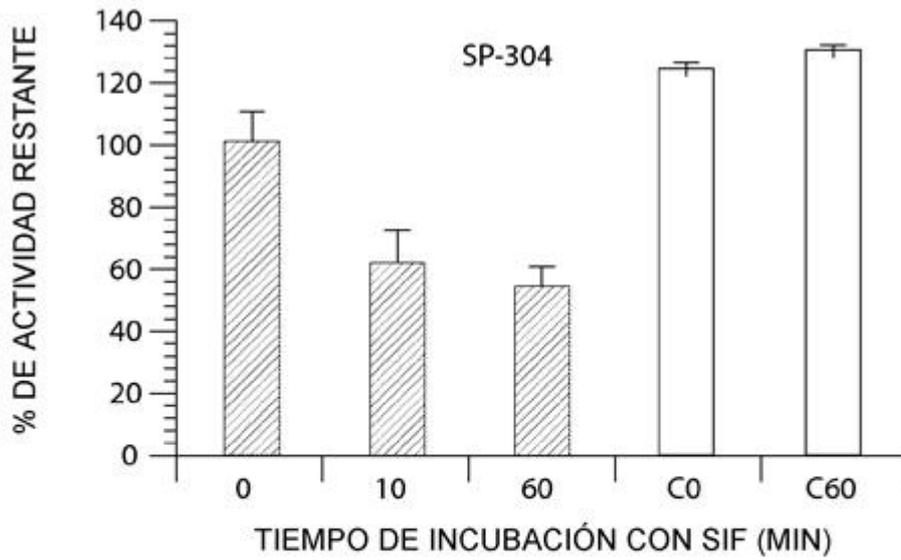


Fig. 7C

XWC DE DATOS ESPECTRALES DE DAD: DE 218,0 A 220,0 nm  
 DE LA MUESTRA 1(M-SCAN #89950 DIGESTO 0 MIN) DE 64.wiff

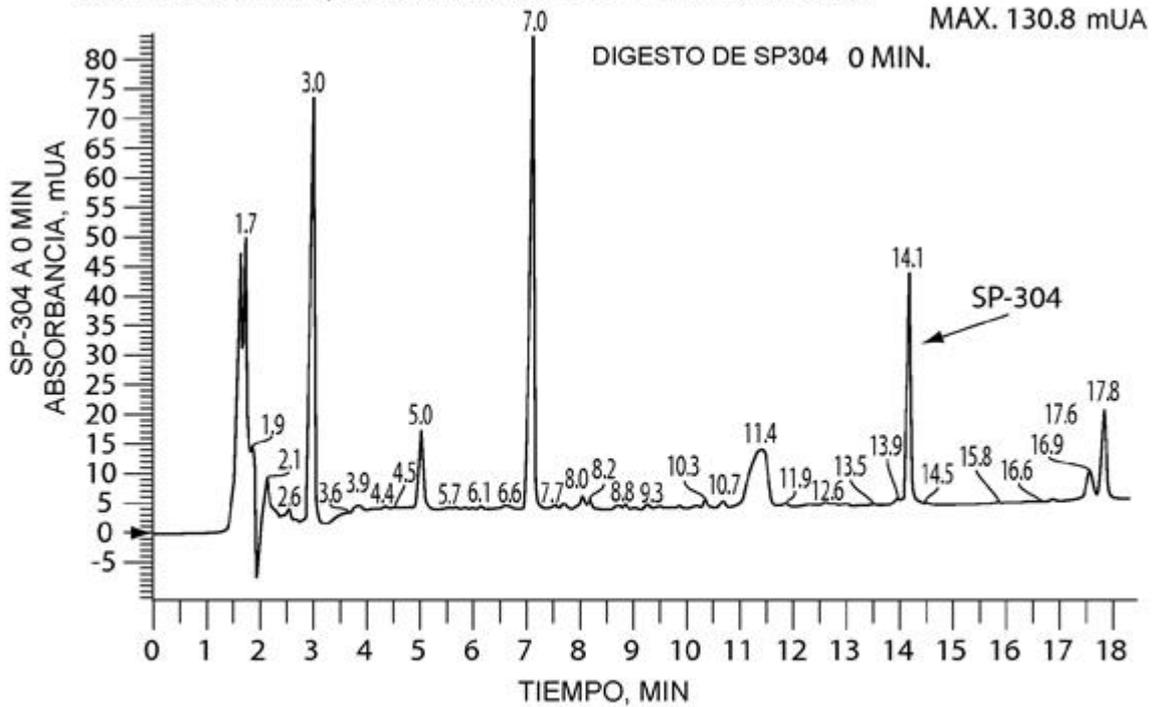


Fig. 7D-1

XWC DE DATOS ESPECTRALES DE DAD: DE 218,0 A 220,0 nm  
DE LA MUESTRA 1(M-SCAN #89950 DIGESTO 0 MIN) DE67.wiff

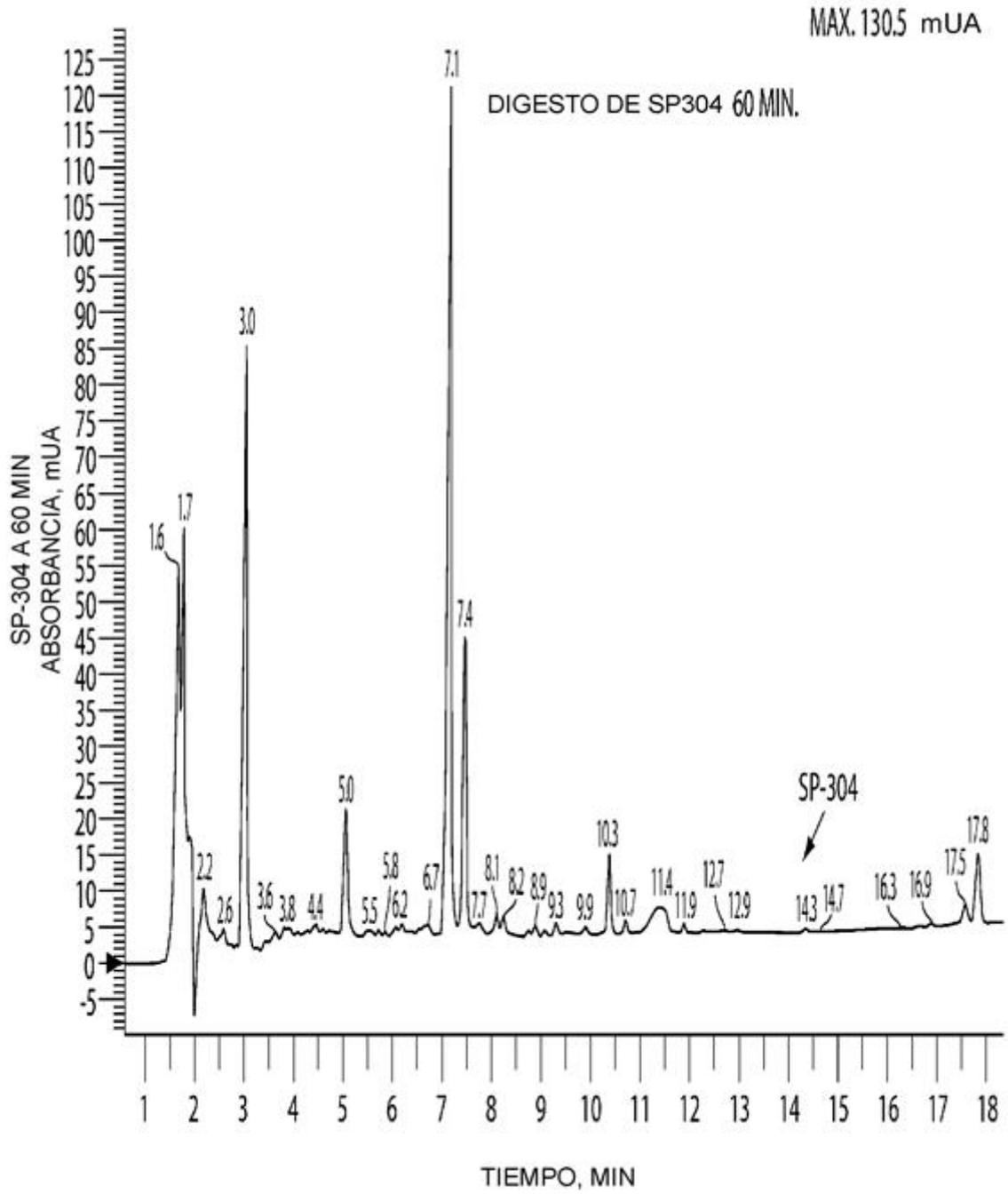


Fig. 7D-2

XWC DE DATOS ESPECTRALES DE DAD: DE 218,0 A 220,0 nm  
DE LA MUESTRA 1 (M-SCAN #89608 CONTROL 0 MIN) DE 54.wiff

MAX. 130.6mUA

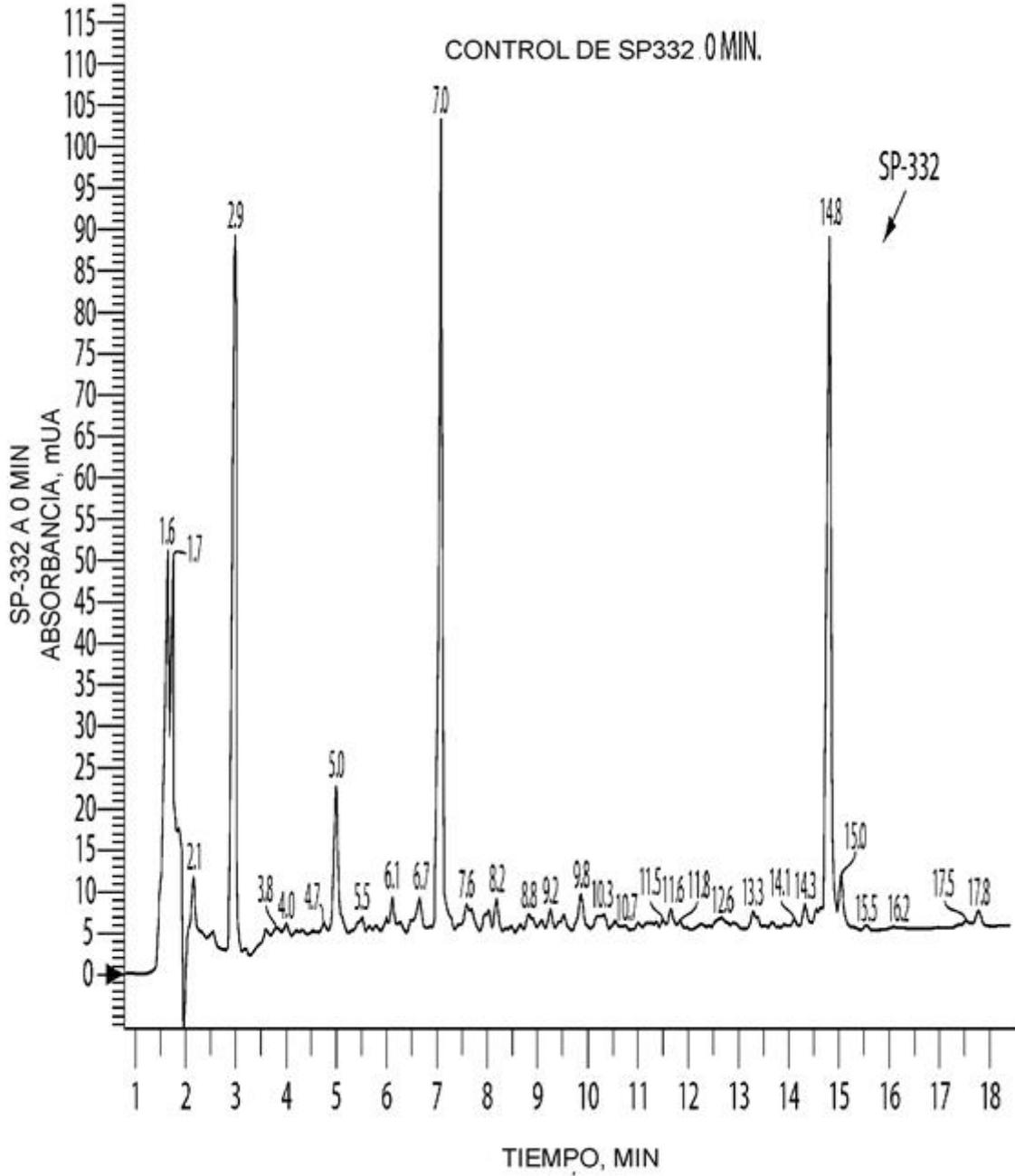


Fig. 7E-1

XWC DE DATOS ESPECTRALES DE DAD: DE 218,0 A 220,0 nm  
DE LA MUESTRA 1 (M-SCAN #89608 CONTROL 120 MIN) DE61.wiff

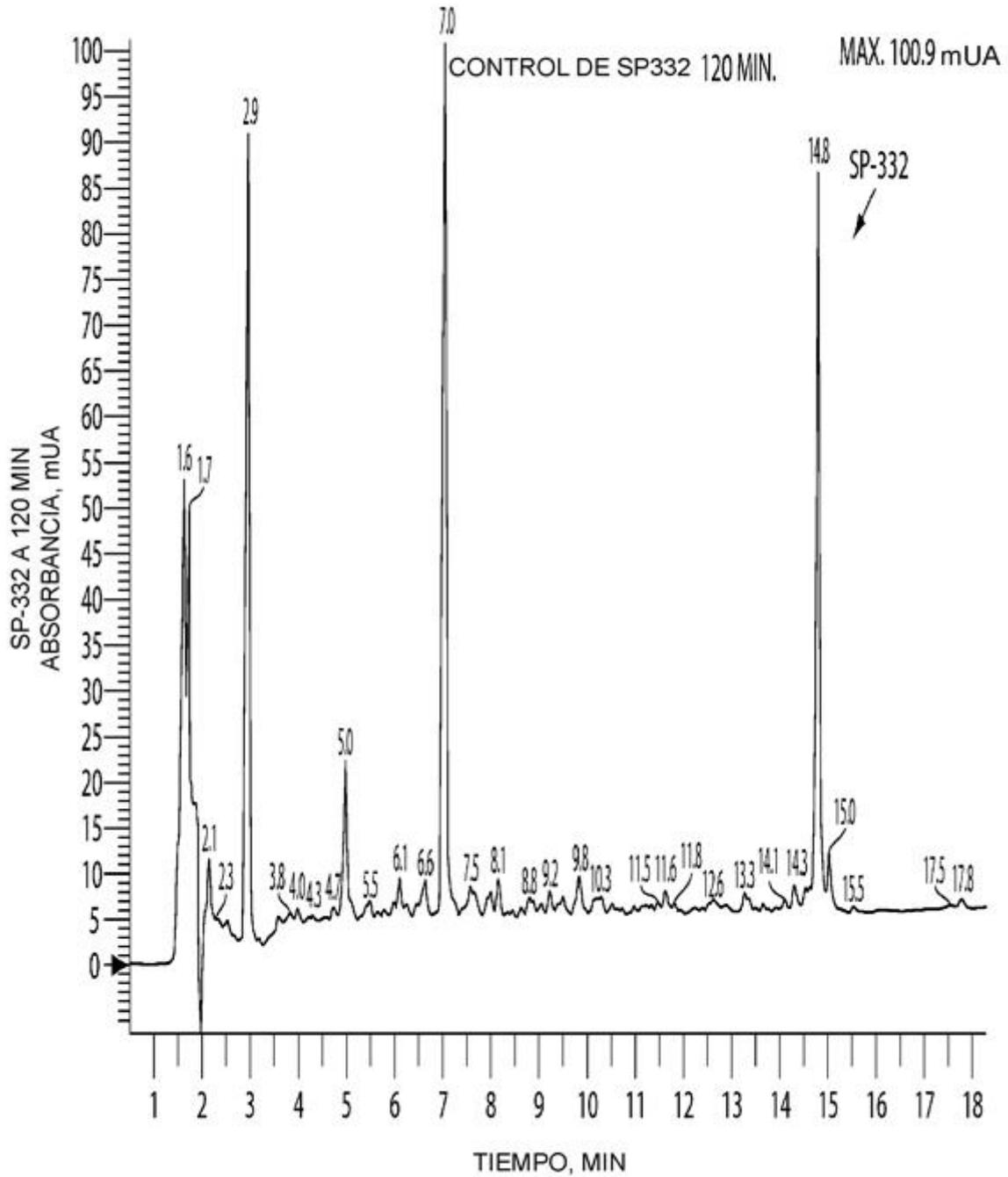


Fig. 7E-2

XWC DE DATOS ESPECTRALES DE DAD: DE 218,0 A 220,0 nm  
DE LA MUESTRA 1 (M-SCAN #89609 CONTROL 0 MIN) DE 76.wiff

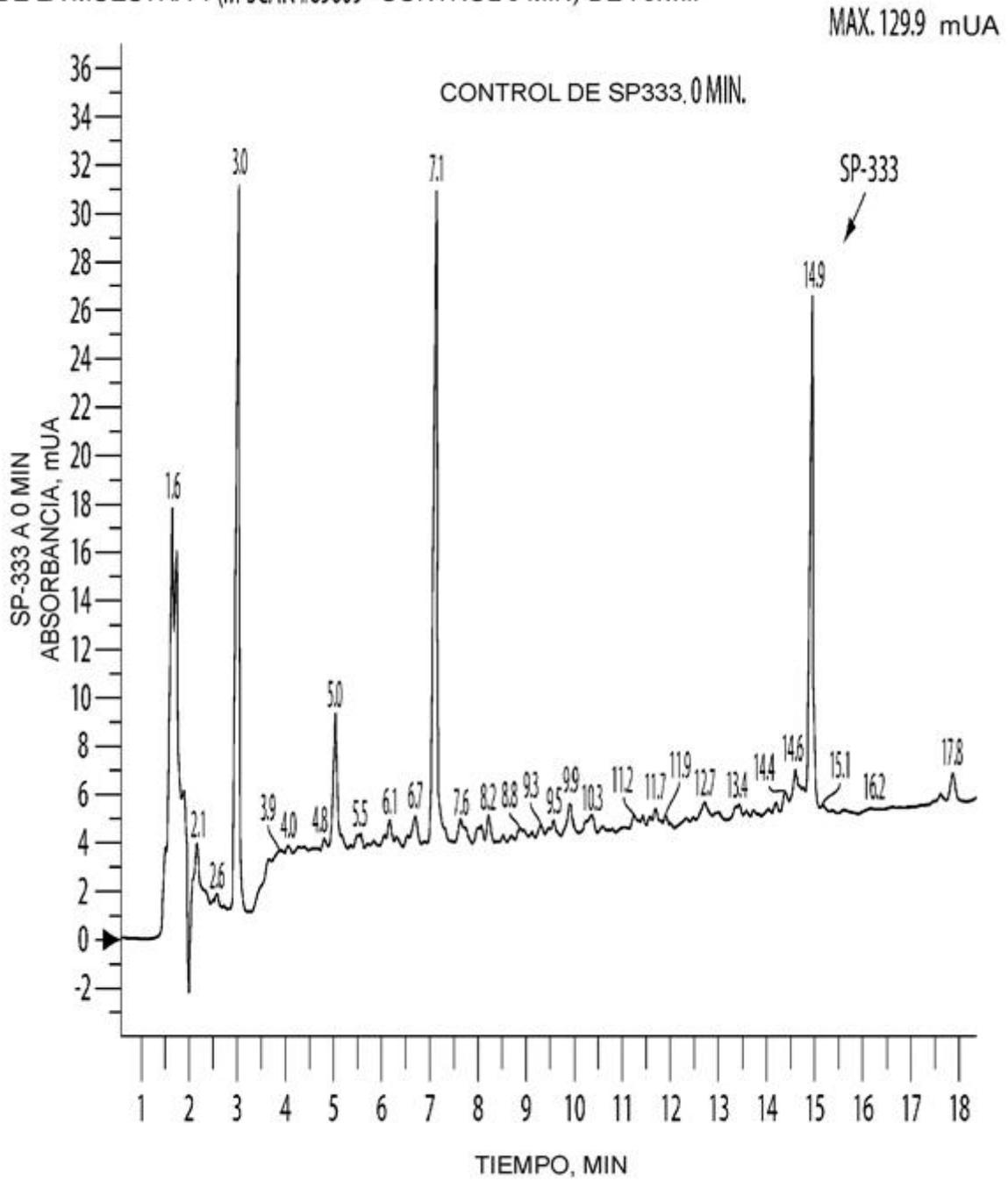


Fig. 7F-1

XWC DE DATOS ESPECTRALES DE DAD: DE 218,0 A 220,0 nm  
DE LA MUESTRA 1(M-SCAN #89609 CONTROL 120 MIN) DE 83.wiff

MAX. 131.9 mUA

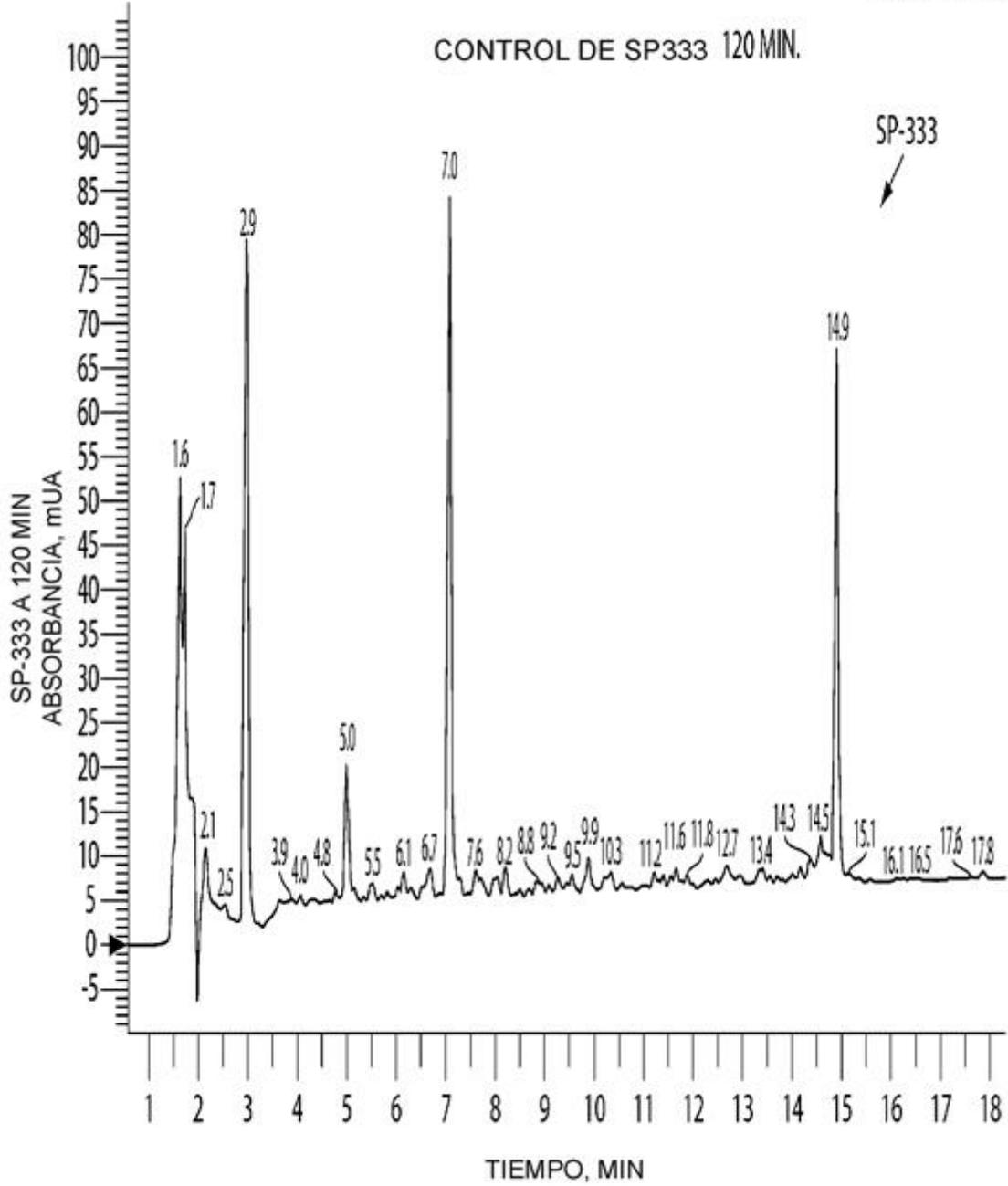


Fig. 7F-2

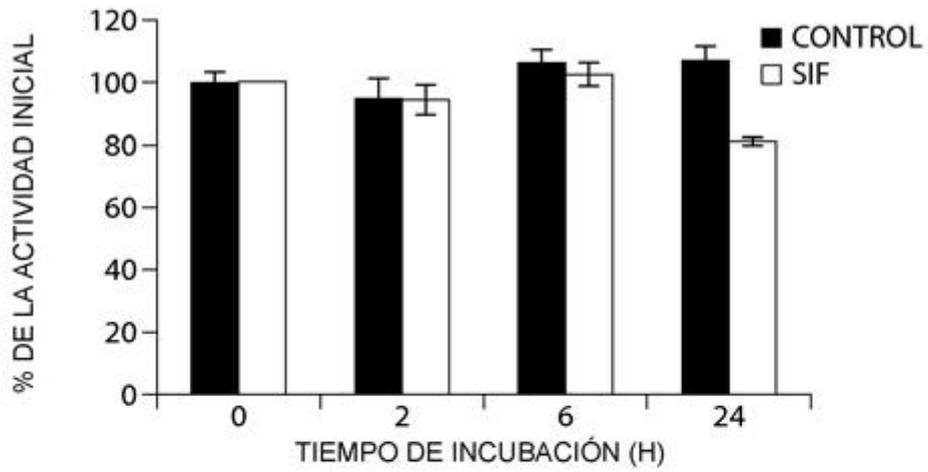


Fig. 7G-1

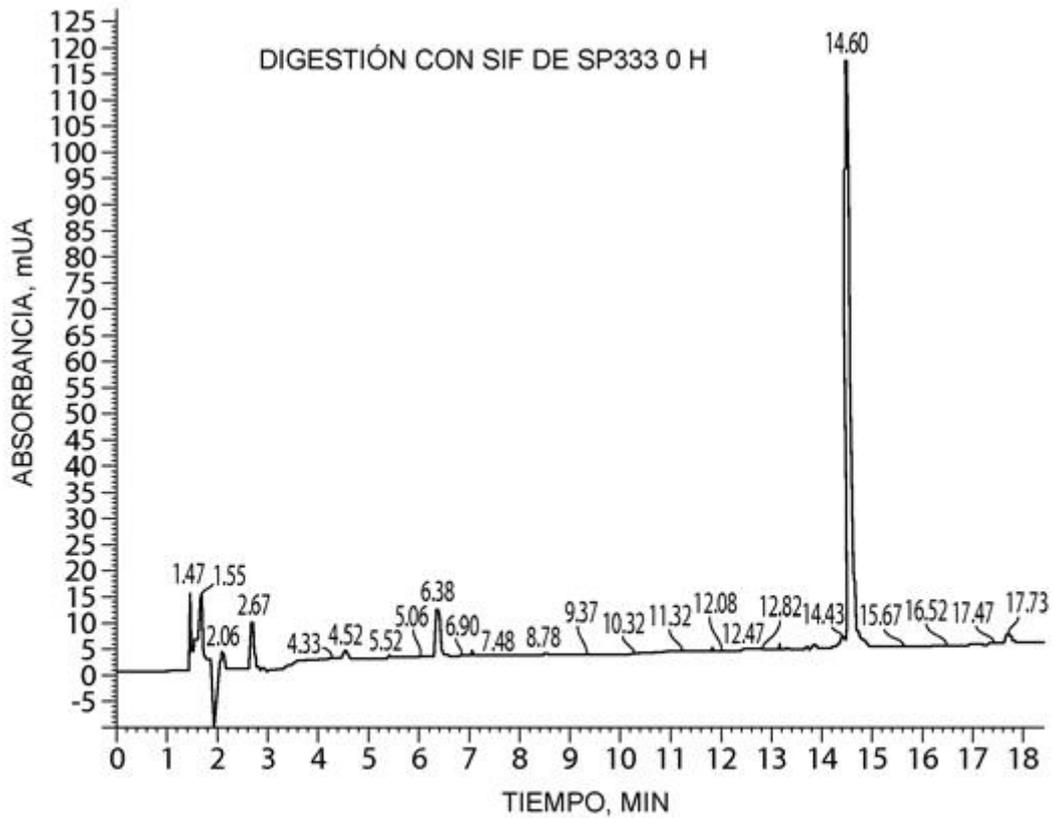


Fig. 7G-2

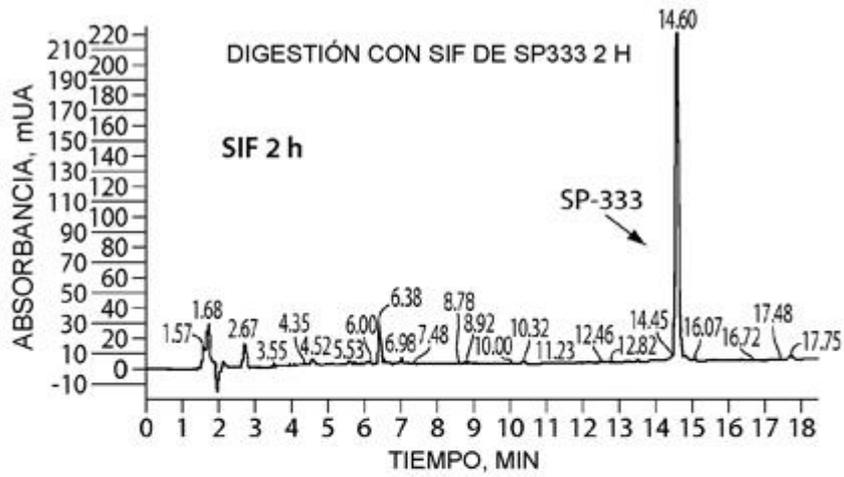


Fig. 7G-3

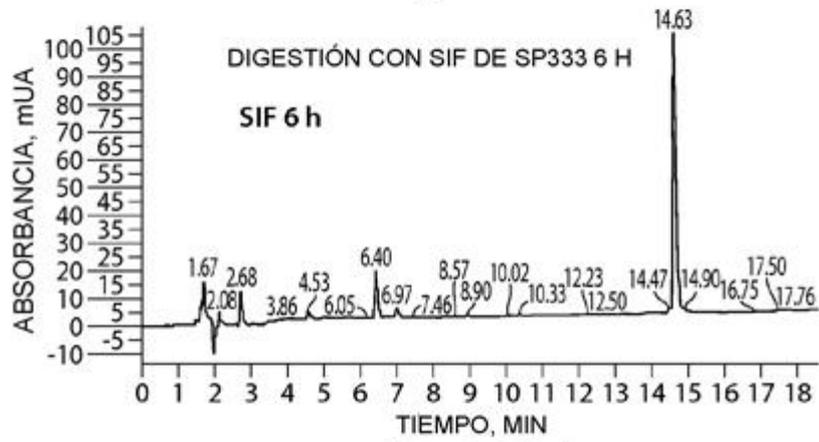


Fig. 7G-4

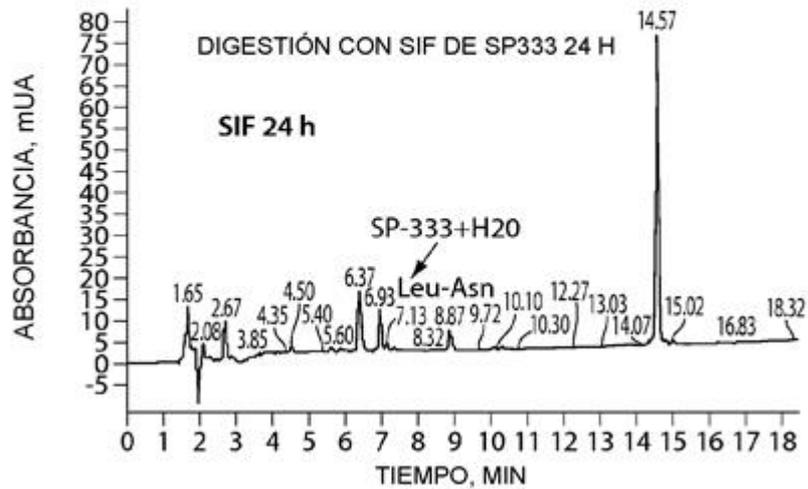


Fig. 7G-5

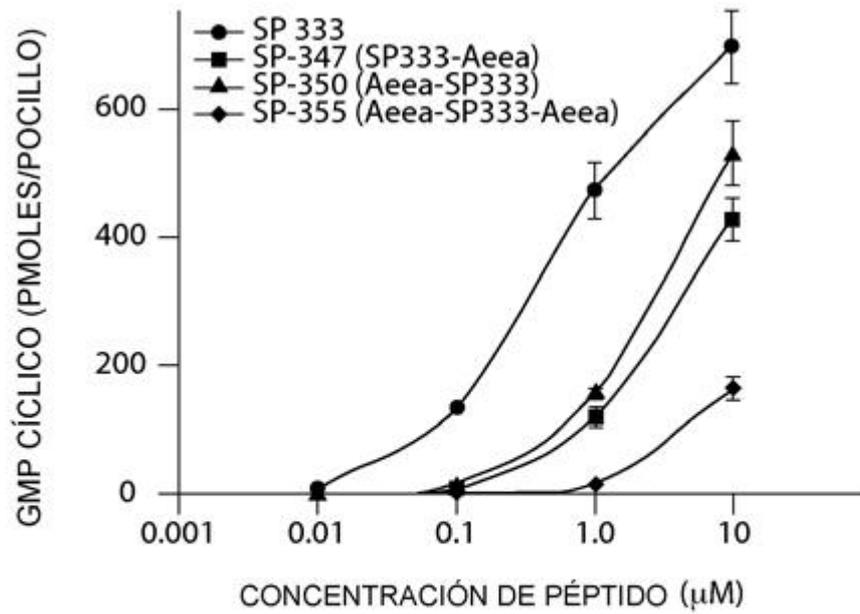


Fig. 8

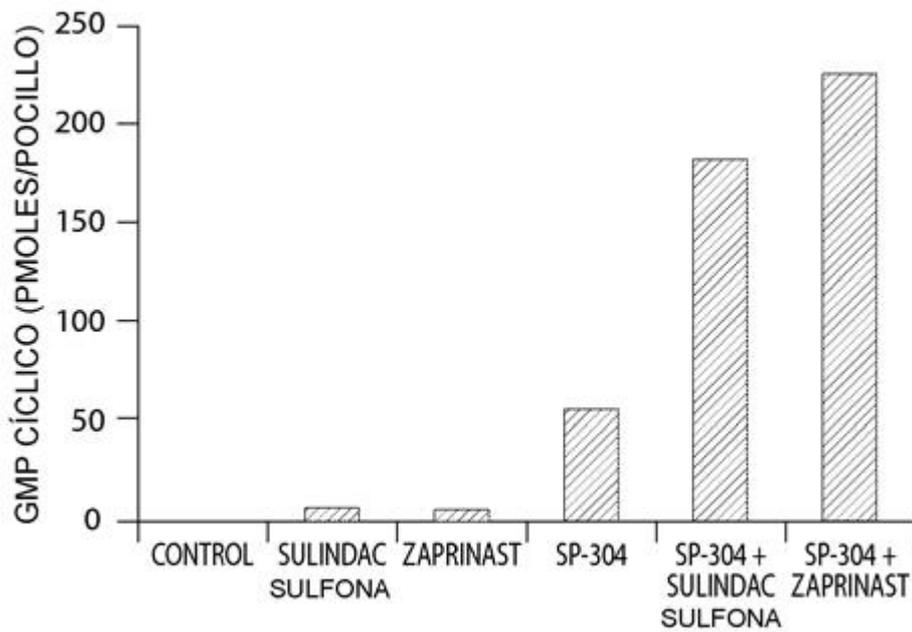


Fig. 9

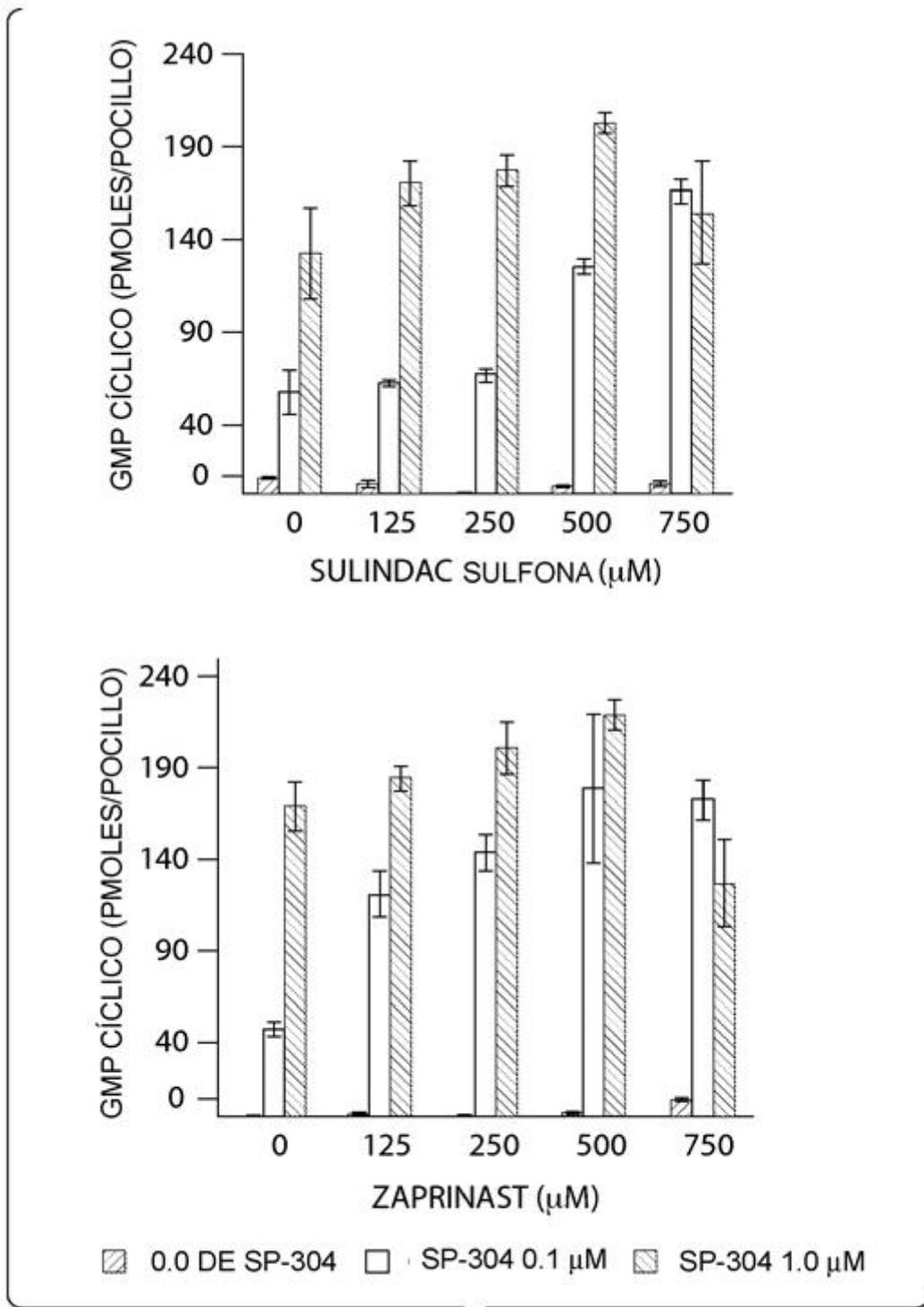


Fig. 10

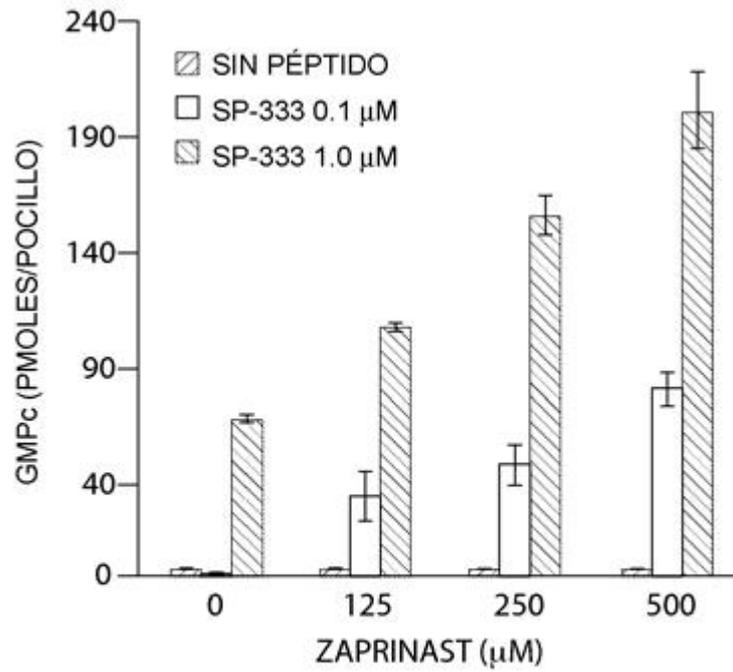


Fig. 11

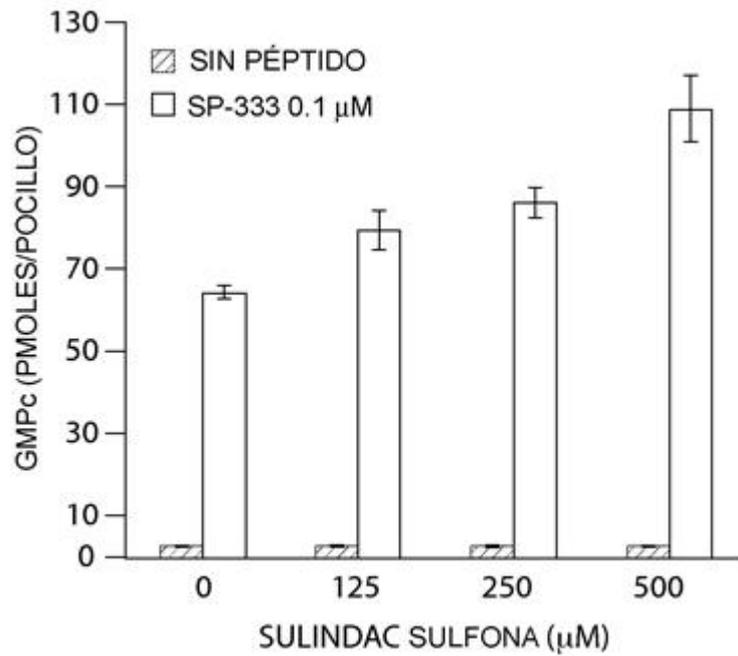


Fig. 12

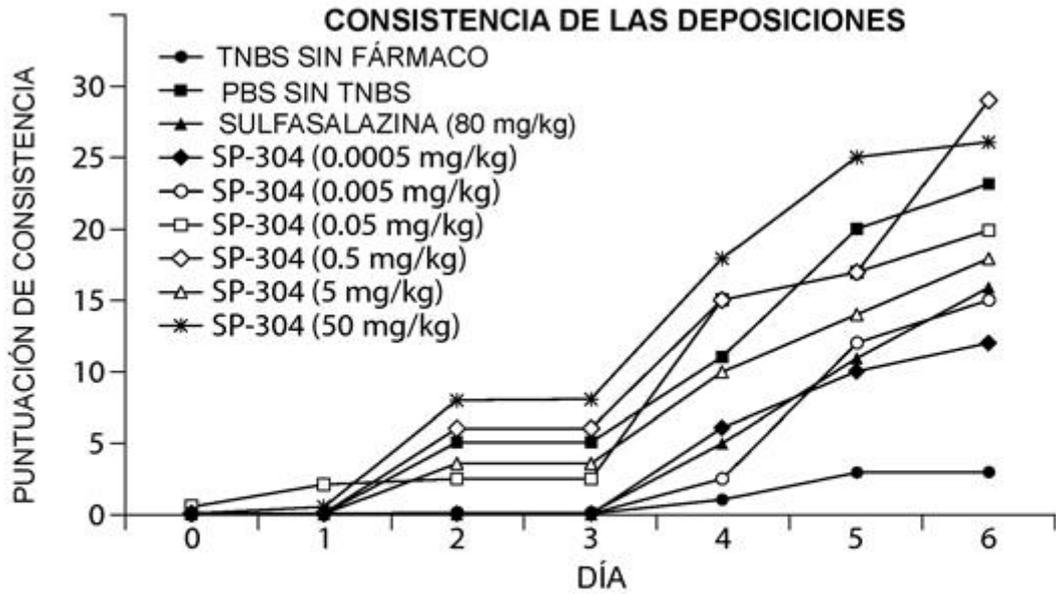


Fig. 13

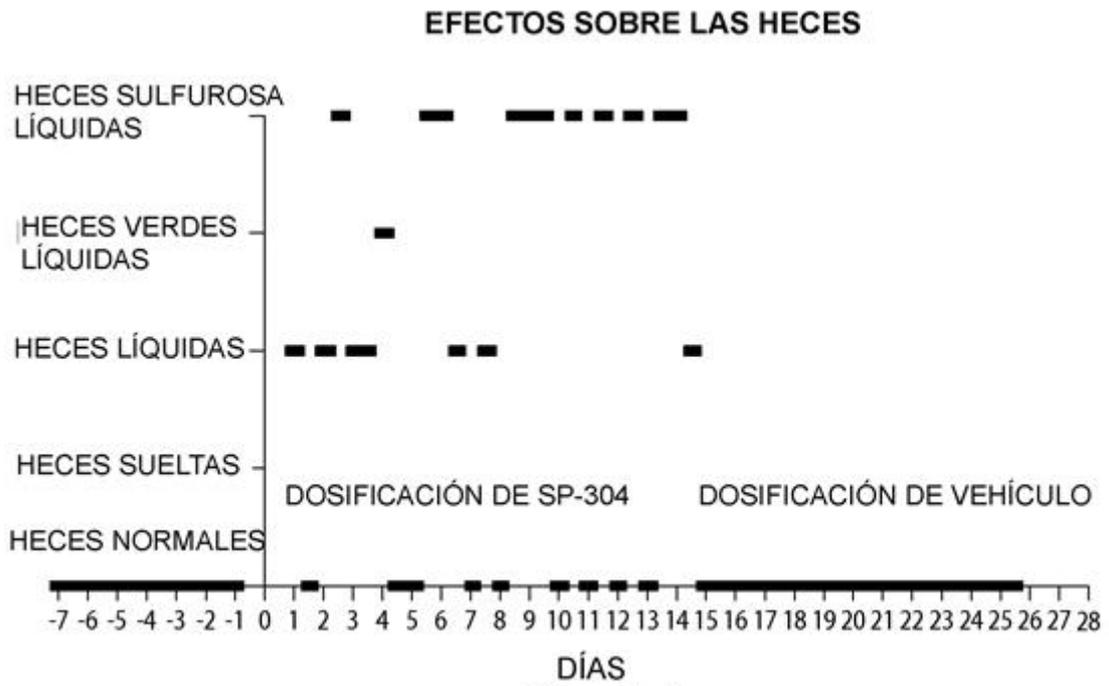
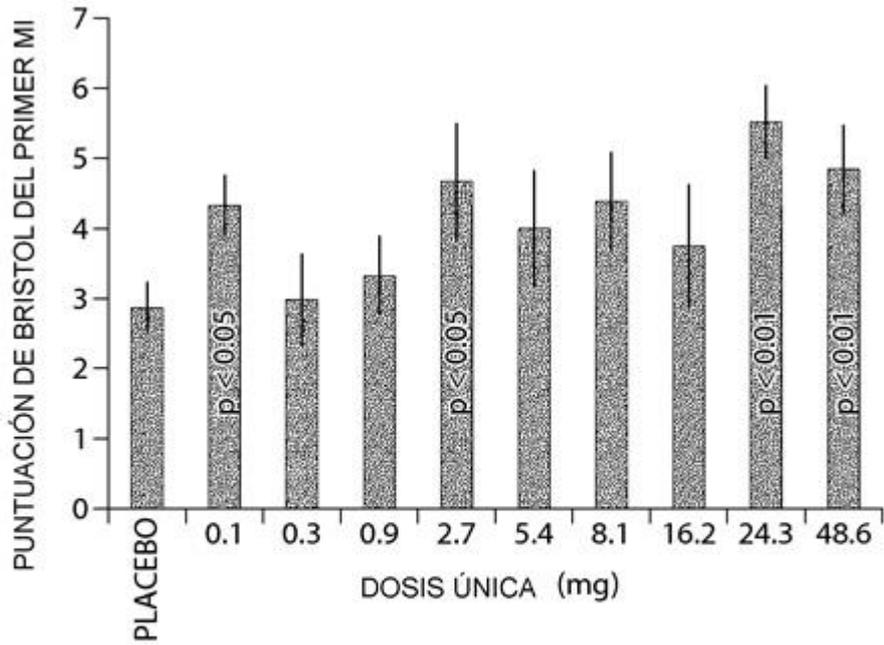


Fig. 14



\*PRUEBA DE DOS MUESTRAS DE WILCOXON DE TRATAMIENTO FRENTE A PLACEBO UNILATERAL

Fig. 15A

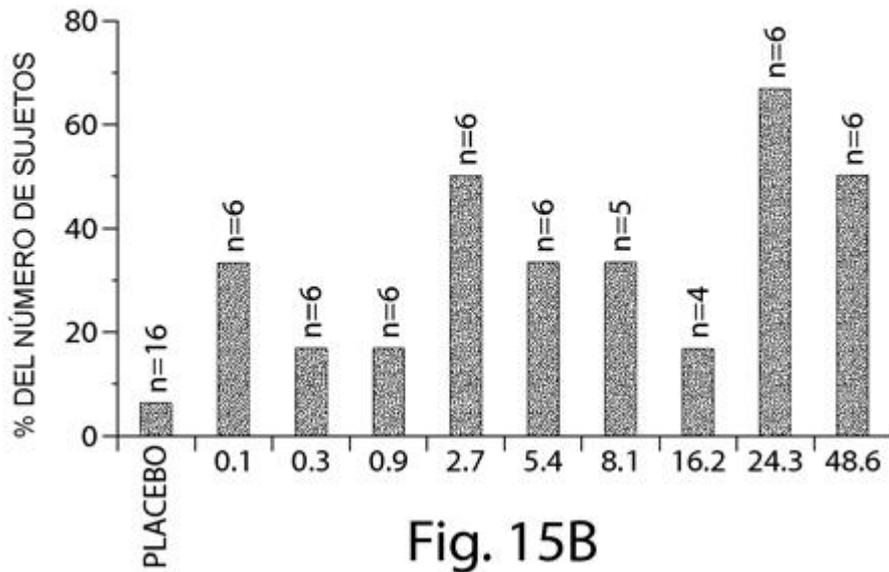


Fig. 15B

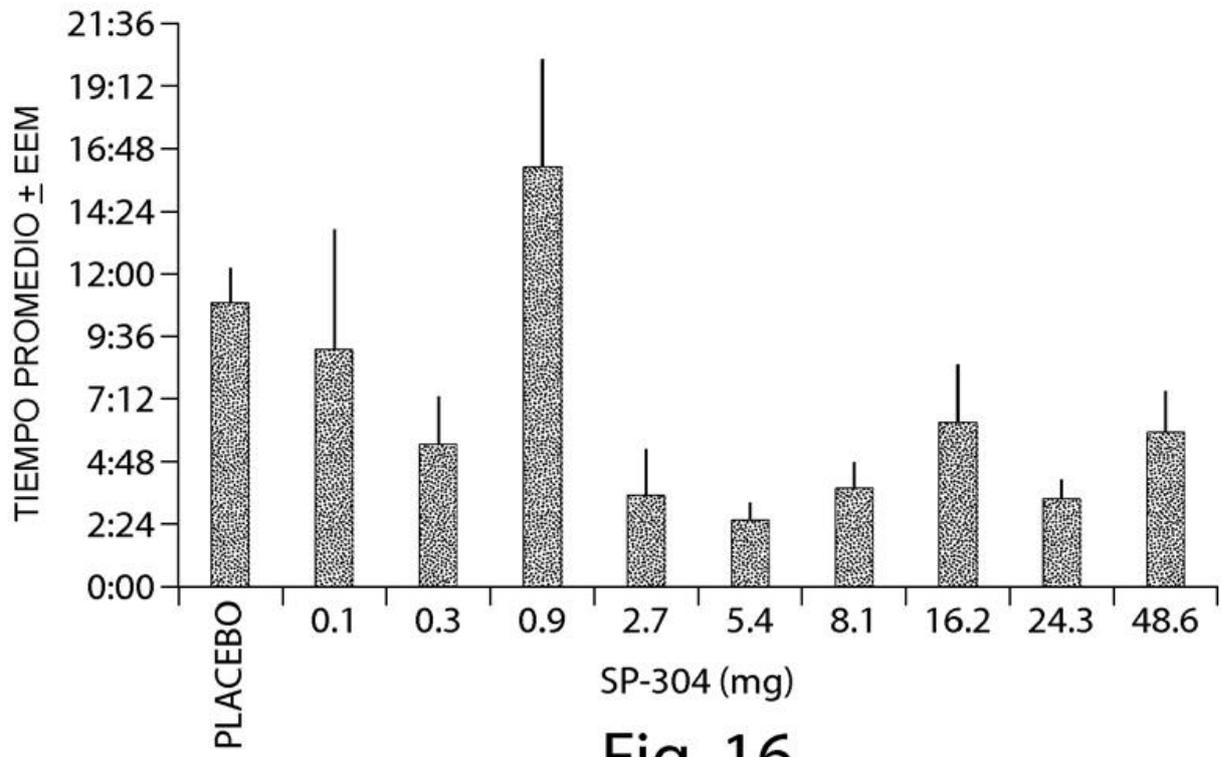


Fig. 16

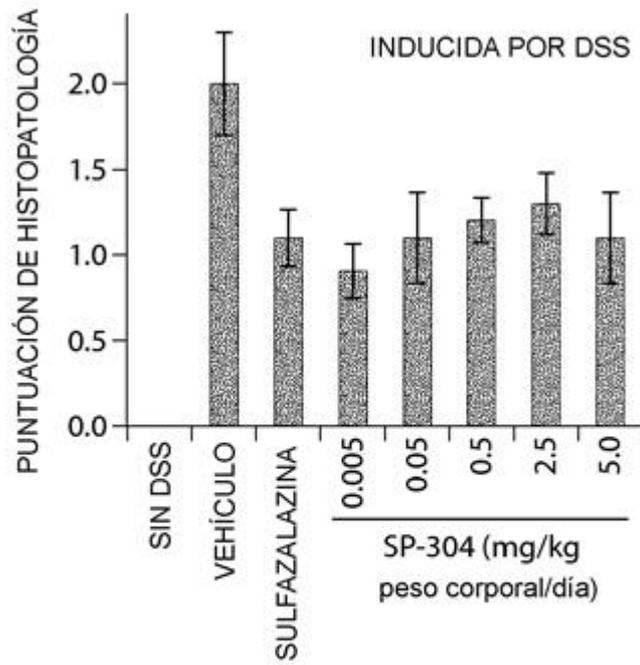


Fig. 17A

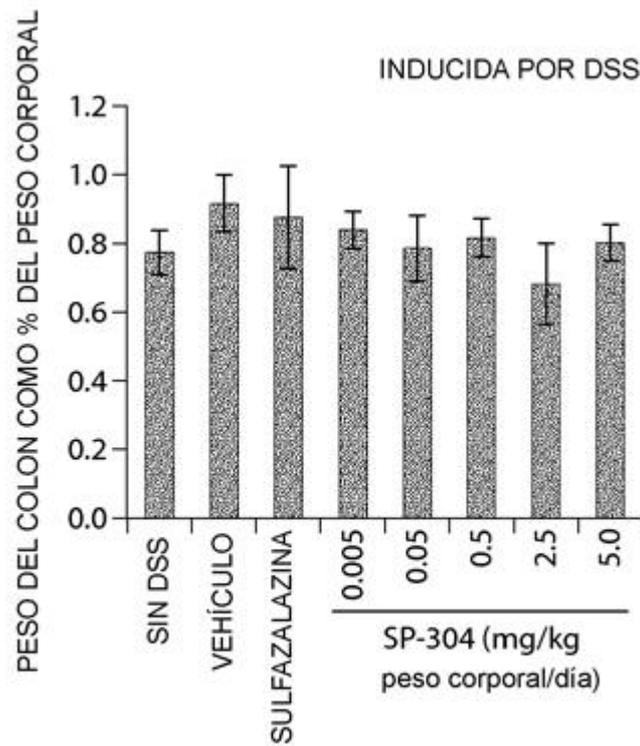


Fig. 17B

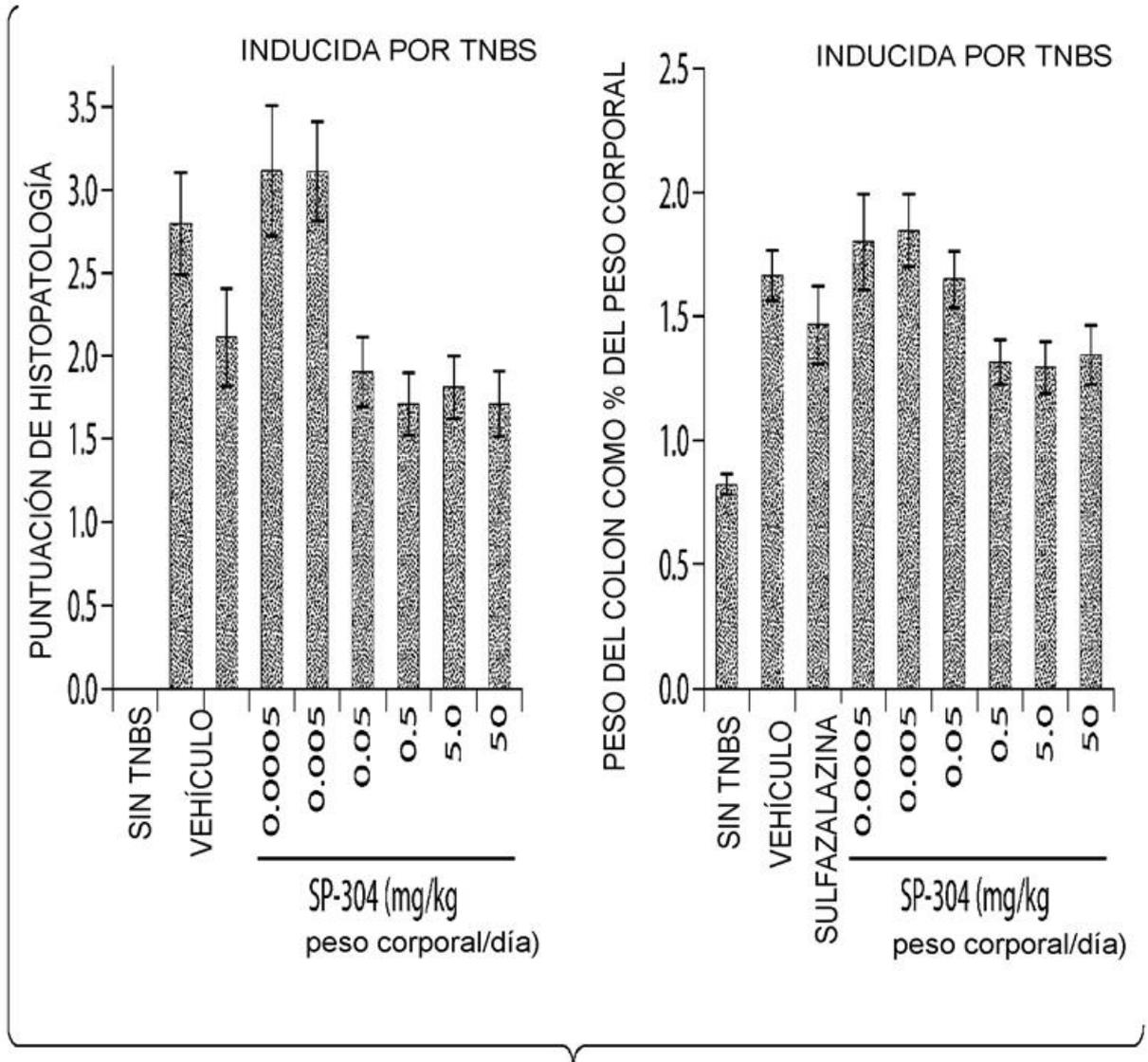


Fig. 18

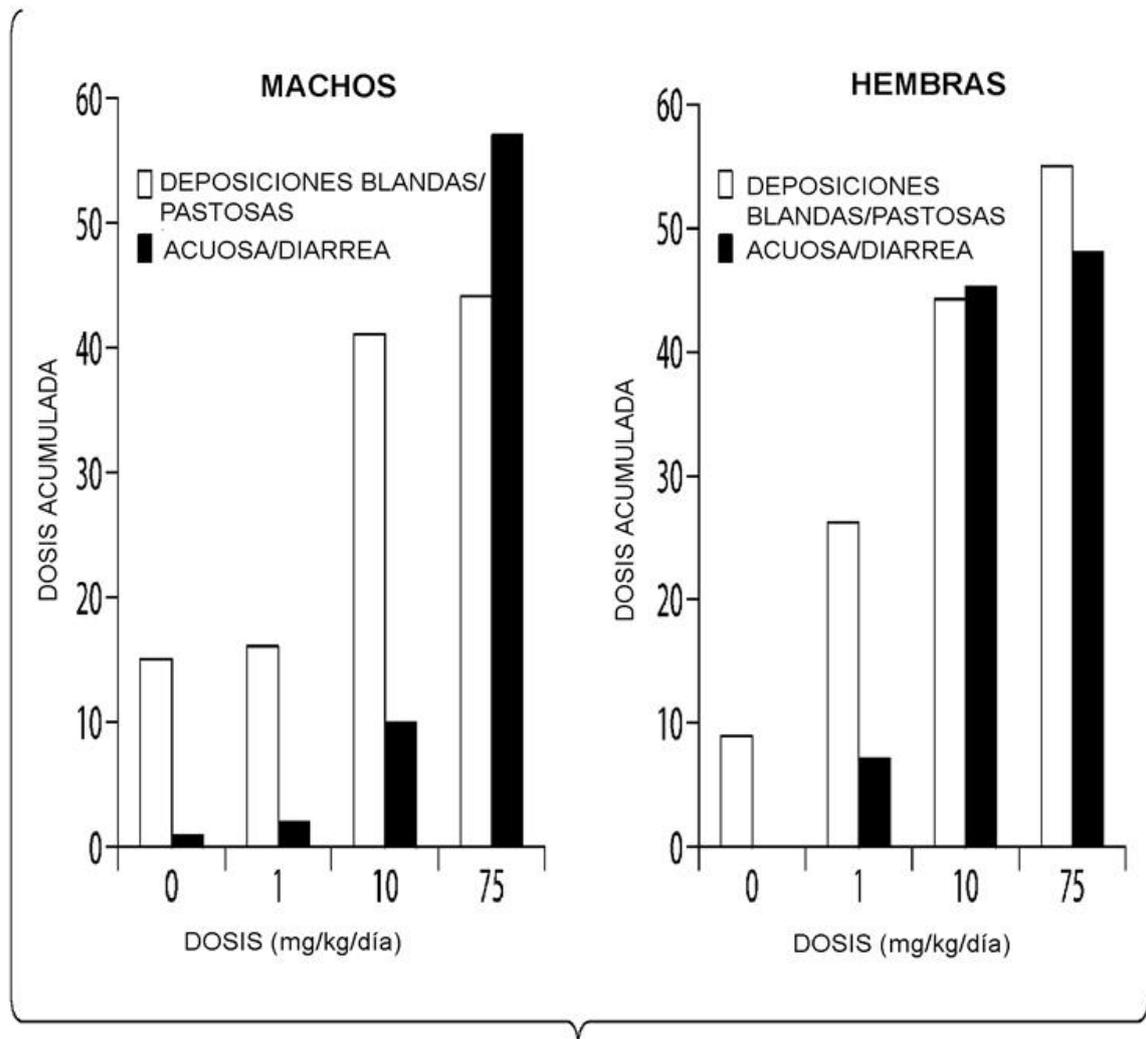
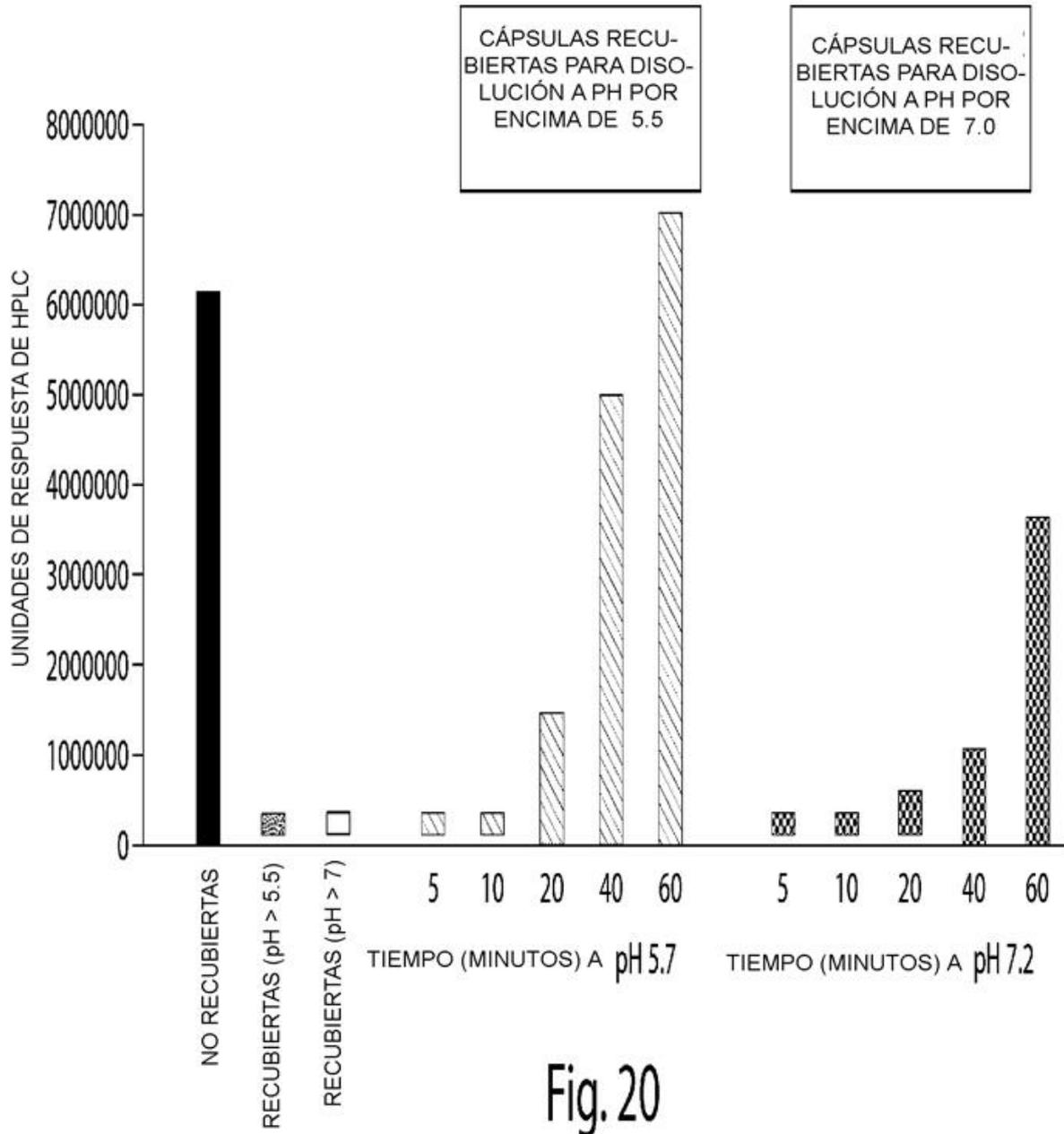


Fig. 19



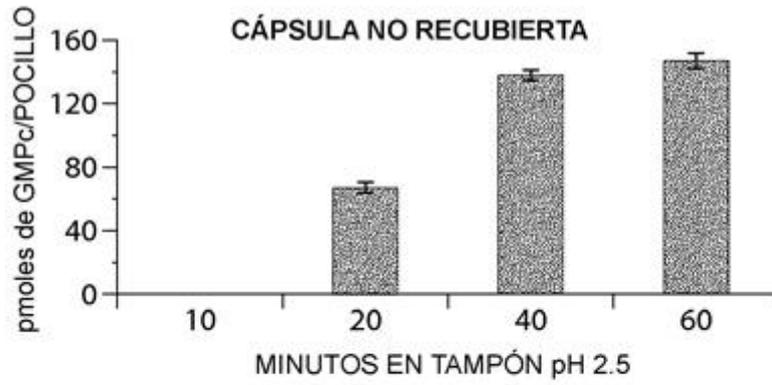


Fig. 21A

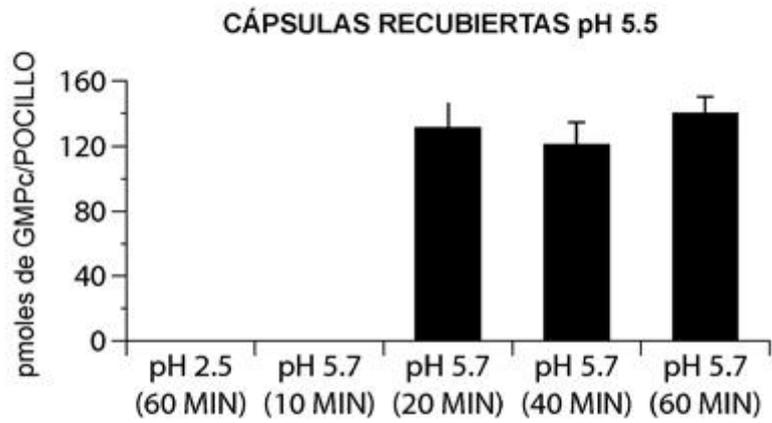


Fig. 21B

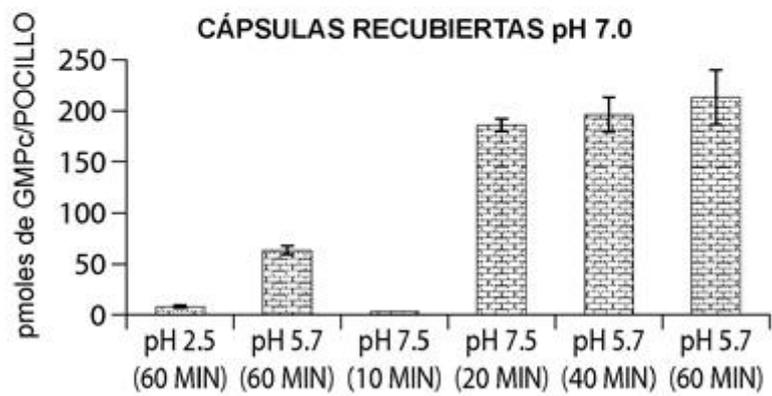


Fig. 21C

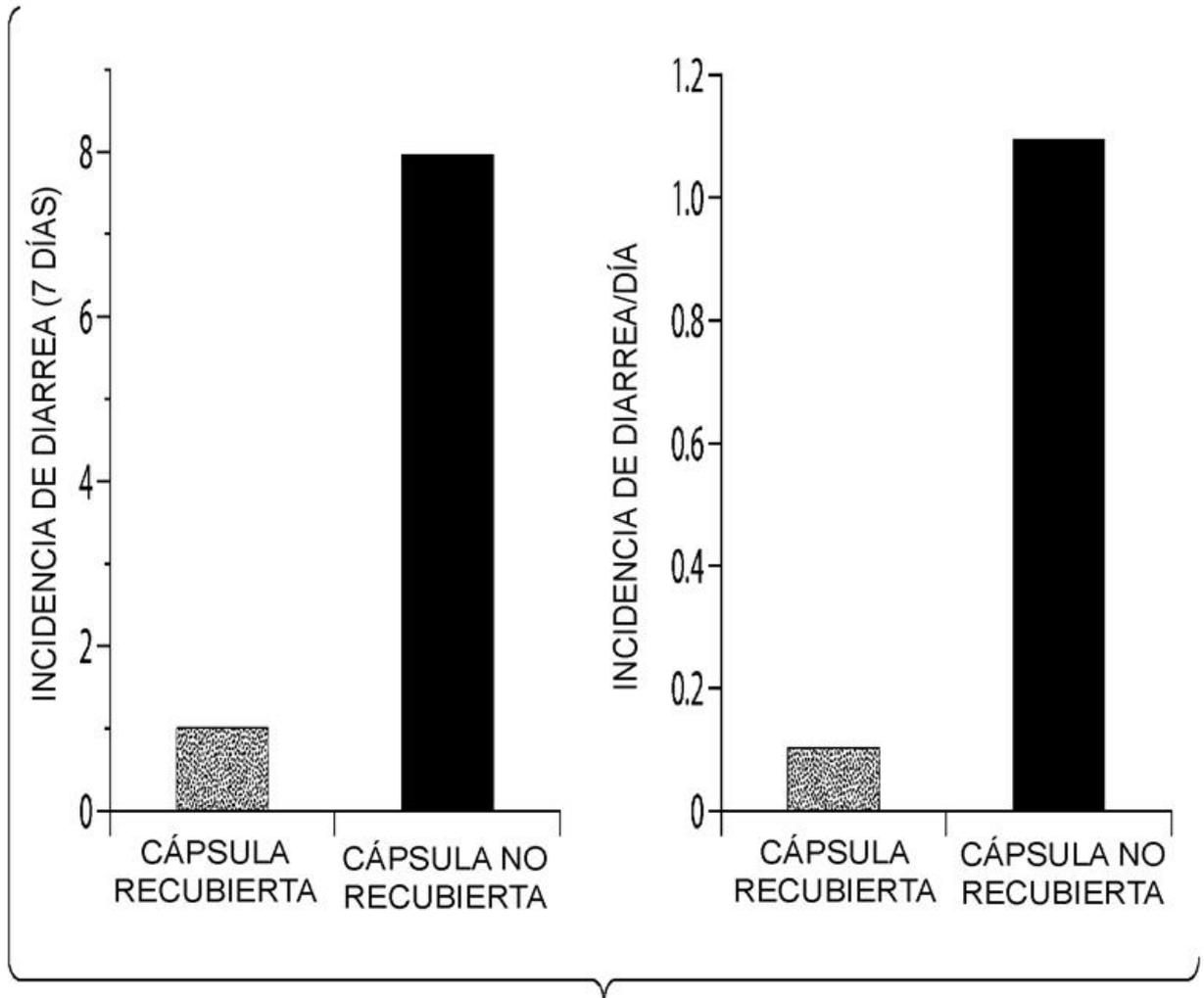


Fig. 22

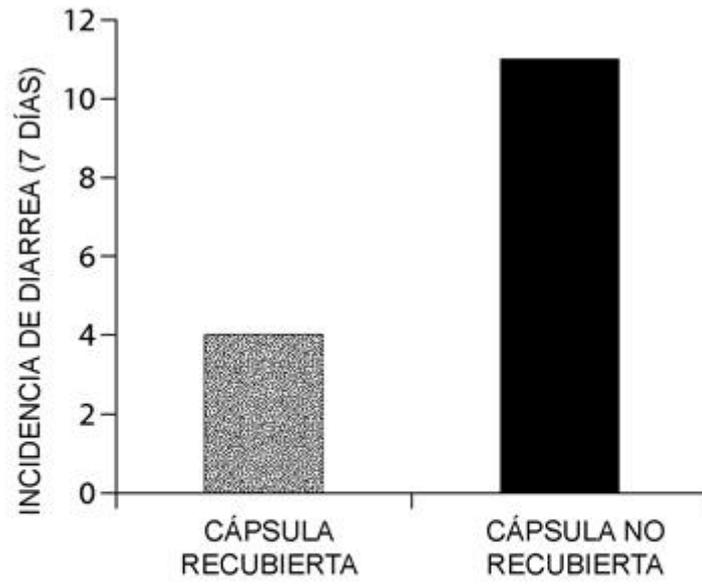


Fig. 23A

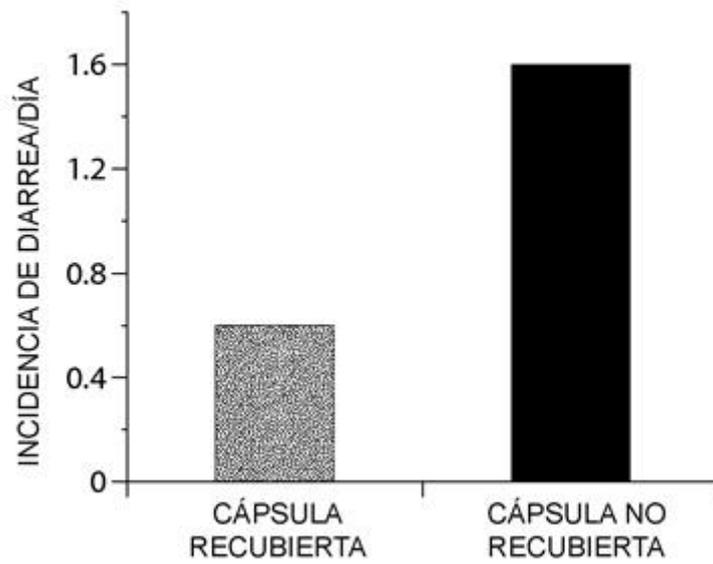


Fig. 23B