(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 622 468**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/00	(2006.01)
C07K 7/64	(2006.01)
A61K 38/04	(2006.01)
A61K 38/12	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2002** **E 10184924 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017** **EP 2301952**

(54) Título: **Agonistas del receptor de guanilato ciclasa para el tratamiento de inflamación tisular y carcinogénesis**

(30) Prioridad:

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

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2017

(73) Titular/es:

Synergy Pharmaceuticals, Inc. (100.0%)
420 Lexington Avenue, Suite 2012
New York, NY 10170, US

(72) Inventor/es:

SHAILUBHAI, KUNWAR;
NIKIFOROVICH, GREGORY y
JACOB, GARY S.

(74) Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 622 468 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso terapéutico de agonistas del receptor de guanilato ciclasa como un medio para potenciar la producción intracelular de GMPc. Los agonistas pueden usarse o en solitario o en combinación con inhibidores de fosfodiesterasa específica de GMPc para prevenir o tratar crecimientos cancerosos, precancerosos y metastásicos, particularmente en el tracto gastrointestinal y en los pulmones. Además, los agonistas pueden usarse en el tratamiento de trastornos inflamatorios tales como colitis ulcerosa y asma.

Antecedentes de la invención

Los péptidos uroguanilina, guanilina y ST bacteriano son péptidos estructuralmente relacionados que se unen al receptor de guanilato ciclasa y estimulan la producción intracelular del guanosin monofosfato cíclico (GMPc) (1-6). Esto da como resultado la activación del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), un canal de membrana apical para la salida de cloro de enterocitos que recubren el tracto intestinal (1-6). La activación del CFTR y la potenciación posterior de la secreción transepitelial de cloro conducen a la estimulación del sodio y a la secreción de agua en el lumen intestinal. Por lo tanto, sirviendo como reguladores paracrinos de actividad CFTR, los agonistas del receptor de GMPc regulan el transporte de fluido y electrolitos en el tracto GI (1-6; patente US 5.489.670).

El proceso de renovación epitelial implica la proliferación, migración, diferenciación, senescencia y eventual pérdida de células del GI en el lumen (7, 8). La mucosa GI puede dividirse en tres áreas distintas basándose en el índice de proliferación de las células epiteliales. Una de estas zonas, la zona proliferativa, consta de células madre indiferenciadas responsables de proporcionar una fuente constante de nuevas células. Las células madre migran hacia la parte superior del lumen del cual se extruyen. A la vez que migran, las células pierden su capacidad de dividirse y comienzan a diferenciarse realizando funciones especializadas de la mucosa GI (9). La renovación de la mucosa GI es muy rápida produciéndose la renovación completa en un periodo de 24-48 horas (9). Durante este proceso las células mutadas e indeseadas se reemplazan por nuevas células. Por tanto, la homeostasis de la mucosa GI se regula por un mantenimiento continuo del equilibrio entre las tasas de proliferación y apoptóticas (8).

Las tasas de proliferación y apoptosis celular en el epitelio intestinal pueden aumentar o disminuir en una amplia variedad de circunstancias distintas, por ejemplo, en respuesta a estímulos fisiológicos tales como envejecimiento, señales inflamatorias, hormonas, péptidos, factores de crecimiento, agentes químicos y hábitos alimenticios. Además, una tasa de proliferación potenciada se asocia frecuentemente con una reducción en el tiempo de renovación y una expansión del área proliferativa (10). Se ha observado que el índice de proliferación es mucho más elevado en casos patológicos de colitis ulcerosa y otros trastornos GI (11). Por tanto, la hiperplasia intestinal es el principal promotor de la inflamación gastrointestinal y la carcinogénesis.

Además de una función de la uroguanilina y guanilina como moduladores del fluido intestinal y de la secreción de iones, estos péptidos también pueden estar implicados en la renovación continua de la mucosa GI. Datos anteriormente publicados en el documento WO 01/25266 sugieren que un péptido con el dominio activo de uroguanilina que puede funcionar como un inhibidor del desarrollo de pólipos en el colon y puede constituir un tratamiento del cáncer de colon. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se reivindica que se produce esto es cuestionable, ya que el documento WO 01/25266 enseña péptidos agonistas de uroguanilina que se unen específicamente al receptor de guanilato ciclasa, denominado GC-C, que se describió por primera vez como el receptor de la enterotoxina termoestable de *E. coli* (ST) (4). Los ratones knockout que carecen de este receptor de guanilato ciclasa muestran resistencia a ST en el intestino, pero los efectos de la uroguanilina y ST no están alterados en el riñón *in vivo* (3). Estos resultados se confirmaron posteriormente por el hecho de que la despolarización de la membrana inducida por la guanilina se bloqueó por genisteína, un inhibidor de tirosina quinasa, aunque la hiperpolarización inducida por uroguanilina estaba afectada (12,13). Tomados en su conjunto estos datos sugieren que la uroguanilina también se une al receptor normalmente desconocido, que es distinto de GC-C.

Otros documentos han descrito que la producción de uroguanilina y guanilina disminuye drásticamente en pólipos colónicos precancerosos y tejidos tumorales (14-17). Además, se ha mostrado que los genes tanto de uroguanilina como de guanilina están localizados en regiones del genoma frecuentemente asociadas con pérdida de heterocigosidad en el carcinoma de colon humano (18-20). Considerándolos en su conjunto, estos hallazgos indican que la uroguanilina, la guanilina y otros péptidos con actividad similar pueden usarse en la prevención o el tratamiento de crecimientos colónicos anómalos. Esta propuesta se reforzó mediante un estudio reciente que demostraba que la administración oral de uroguanilina inhibía la formación de pólipos en ratones (15,16).

Los péptidos de uroguanilina y guanilina también parecen promover la apoptosis controlando el flujo iónico celular. Las alteraciones en la apoptosis se han asociado con progresión tumoral en el fenotipo metastásico. Aunque el

cáncer gastrointestinal (GI) primario está limitado al intestino delgado, colon y recto, éste puede metastatizar y propagarse a dichas localidades como hueso, ganglios linfáticos, hígado, pulmón, peritoneo, ovarios, cerebro. Potenciando el eflujo de K+ y el influjo de Ca++, la uroguanilina y péptidos relacionados pueden promover la muerte de células transformadas y por lo tanto inhibir la metástasis.

Una de las manifestaciones clínicas de la actividad de CFTR reducida es la inflamación de las vías respiratorias (21). Este efecto puede deberse a la regulación de CTFR de la expresión de NF-kB, quimiocinas y citocinas (22-25). Informes recientes también sugieren que el canal CFTR está implicado en el transporte y mantenimiento del glutatión reducido, un antioxidante que desempeña una función importante en la protección contra la inflamación causada por estrés oxidativo (39). Se esperaría que la potenciación de los niveles intracelulares de GMPc regulase negativamente estos estímulos inflamatorios mediante la activación de la guanilato ciclasa o mediante la inhibición de fosfodiesterasa específica de GMPc. Por tanto, los agonistas de tipo uroguanilina deben ser útiles en la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias pulmonares (por ejemplo asma), intestinales (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), pancreáticas y de otros órganos.

El documento US 6060037(A) describe compuestos que comprenden una fracción que se une al receptor de la enterotoxina termoestable, ST, para su uso en la detección y el tratamiento de tumores colorrectales. El documento WO 02/098912 describe el uso de un péptido activado por guanilato ciclasa C para el tratamiento de problemas de las vías respiratorias. El documento WO 02/062369 describe el uso de uroguanilina y prouroguanilina en combinación con un inhibidor de COX-2 para tratar el cáncer en el intestino. Ohbayashi, H., et. al., Life Sciences (1998), 62(20): 1833-1844 describen los efectos de la uroguanilina y de la guanilina contra la broncoconstricción inducida por antígeno y la filtración microvascular de las vías respiratorias.

En general, se puede llegar a la conclusión de que agonistas del receptor de guanilato ciclasa, tales como uroguanilina, tienen un posible valor terapéutico en el tratamiento de una amplia diversidad de afecciones inflamatorias, del cáncer (particularmente cáncer de colon) y como agentes antimetastásicos. El desarrollo de nuevos agonistas es por lo tanto de sustancial importancia clínica.

Sumario de la invención

La presente invención está basada en el desarrollo de nuevos agonistas del receptor de guanilato ciclasa, y en nuevos usos de agonistas de origen natural. Los agonistas son análogos de uroguanilina, muchos de los cuales tienen propiedades superiores bien en cuanto a una mejor activación, estabilidad y actividad a pH bajo, del receptor o en cuanto a efectos adversos reducidos. Los péptidos pueden usarse para tratar cualquier afección que responda a niveles intracelulares potenciados de GMPc. Los niveles intracelulares de GMPc pueden aumentarse potenciando la producción intracelular de GMPc y/o inhibiendo su degradación mediante fosfodiesterasas específicas de GMPc. Entre las afecciones específicas que pueden tratarse o prevenirse se encuentran las afecciones inflamatorias, cáncer, pólipos y metástasis.

En su primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido como se define en las reivindicaciones adjuntas. También se describe un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID Nº: 2-21 y a composiciones terapéuticas que contienen estos péptidos. La expresión "consiste esencialmente en" incluye péptidos que son idénticos a un número de identificación de secuencia indicado y a otras secuencias que no difieren sustancialmente en cuanto a su estructura o función. Para el propósito de la presente solicitud, un péptido difiere sustancialmente si su estructura varía en más de tres aminoácidos de un péptido de SEC ID Nº: 2-21 o si su activación de producción de GMPc celular se reduce o potencia en más de 50%. Preferentemente, los péptidos sustancialmente similares deberían diferir en no más de dos aminoácidos y no diferir en más de aproximadamente 25% con respecto a la activación de la producción de GMPc. El péptido más preferido es un biciclo que tiene la secuencia de SEC ID Nº: 20.

Los péptidos 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 sola entidad de administración del fármaco, por ejemplo, un comprimido, una cápsula, una solución o una formulación de inhalación. La cantidad de péptido presente debe de ser suficiente para que tenga un efecto terapéutico positivo cuando se administra a un paciente (típicamente, entre 100 µg y 3 g). Lo que constituye un "efecto terapéutico positivo" que depende de la afección particular que vaya a tratarse e incluirá cualquier mejora significativa en una afección fácilmente reconocida por un experto en la materia. Por ejemplo, puede constituir una reducción de la inflamación, una disminución del tamaño de pólipos o tumores, una reducción de las lesiones metastásicas, etc.

La invención también abarca terapia combinada utilizando un agonista del receptor de guanilato ciclasa administrado bien en solitario o junto con un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc, un agente antiinflamatorio o un agente anticanceroso. Estos agentes deben estar presentes en cantidades conocidas en la técnica para que sean terapéuticamente eficaces cuando se administren a un paciente. Como agentes antineoplásicos pueden incluirse agentes alquilantes, epipodofilotoxinas, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides de la vinca, antibióticos de antraciclina, agentes de mostaza nitrogenada y similares. Como agentes antineoplásicos particulares pueden incluirse tamoxifeno, taxol, etopósido y 5-fluorouracilo. Las terapias con anticuerpos monoclonales y antivíricas

pueden combinarse con composiciones quimioterapéuticas que comprenden al menos un agonista del receptor de guanilato ciclasa a la hora de diseñar un régimen de tratamiento hecho a medida según las necesidades específicas de un paciente.

En el presente documento también se describe un método de prevención, tratamiento o retraso de la aparición de cáncer, particularmente cáncer de células epiteliales, o pólipos, en un sujeto, administrando una composición que comprende una cantidad eficaz de un agonista del receptor de guanilato ciclasa, preferentemente un agonista sintético del receptor de guanilato ciclasa. La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de agonista para aumentar sensiblemente los niveles intracelulares de GMPc. El término "sintético" se refiere a un péptido creado para unirse a un receptor de guanilato ciclasa, pero que contiene determinadas sustituciones de las secuencias de aminoácidos que no están presentes en los agonistas de guanilato ciclasa conocidos endógenos, tales como uroguanilina. El agonista debe ser un péptido seleccionado de los definidos por las SEC ID Nº: 2-21 y que se enumeran en las Tablas 2 y 3. También se describen métodos de tratamiento de cánceres primarios, distintos de cáncer de colon, administrando una dosificación eficaz de un péptido seleccionado del grupo que consiste en: uroguanilina; guanilina; y péptido ST de *E. coli.* Para este propósito puede usarse cualquier forma conocida de uroguanilina o guanilina, aunque se prefieren los péptidos humanos.

En el presente documento también se describen métodos de prevención o tratamiento de metástasis tumoral a partir de una masa tumoral primaria. Las células tumorales metastásicas que tienen receptores de guanilato ciclasa pueden ser la diana de péptidos generados de acuerdo con la invención. En una realización preferida, el receptor diana se encuentra en células de cánceres gastrointestinales (GI) y en células metastatizadas procedentes de esos cánceres. Dichos receptores son típicamente proteínas transmembrana con un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular con actividad guanilato ciclasa. Aunque la invención no está ligada a ningún mecanismo de acción particular, se piensa que los péptidos actuarán uniéndose a estos receptores celulares e induciendo la apoptosis. Los tumores metastásicos también pueden tratarse administrando cualquier forma conocida de uroguanilina o guanilina (preferentemente humana) o administrándose el péptido ST de *E. coli*.

Los péptidos pueden administrarse o en solitario o junto con uno o más inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de GMPc. Los ejemplos de inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de GMPc incluyen sulindac sulfona, zaprinast y motapizona. Las formas de cáncer que pueden tratarse incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer renal y cáncer testicular. La carcinogénesis de colon puede prevenirse inhibiendo el desarrollo de pólipos colorrectales precancerosos mediante la administración de una composición de acuerdo con la invención. Se piensa que los péptidos deben ser especialmente eficaces con respecto al tratamiento del cáncer de colon y en la prevención de la metástasis de tumores de colon.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de tratamiento, prevención o retraso de la aparición de inflamación de un órgano (por ejemplo, inflamación asociada al tracto GI, asma, nefritis, hepatitis, pancreatitis, bronquitis o fibrosis quística) de un sujeto, administrando una composición que comprende un agonista de un receptor de guanilato ciclasa que potencia la producción intracelular de GMPc. Los agonistas peptídicos preferidos se seleccionan del grupo definido por las SEC ID Nº: 2-21 mostradas en las Tablas 2 y 3, o de uroguanilina, o guanilina, o del péptido ST de *E. coli*. Estos péptidos pueden administrarse opcionalmente con uno o más inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de GMPc, por ejemplo, sulindac sulfona, zaprinast o motapizona. En un aspecto preferido, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un trastorno inflamatorio en un tracto gastrointestinal de un mamífero. El trastorno inflamatorio puede clasificarse como una enfermedad inflamatoria intestinal, y más particularmente, puede ser enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. La administración puede ser entérica, y emplear formulaciones hechas a medida para dirigirse a enterocitos.

En un sentido más amplio, la divulgación incluye métodos de inducción de la apoptosis en un paciente administrando una cantidad eficaz de un péptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEC ID Nº: 2 - SEC ID Nº: 21, o uroguanilina o guanilina o péptido ST de *E. coli*. Una “cantidad eficaz” de péptido, en este sentido, se refiere a una cantidad suficiente para aumentar la apoptosis en un tejido diana. Por ejemplo, puede suministrarse un péptido que sea suficiente para inducir una tasa aumentada de muerte celular en un crecimiento neoplásico.

El péptido más preferido para su uso en los métodos descritos anteriormente es el péptido definido por SEC ID Nº: 20. La secuencia se indica a continuación (véase también la Tabla 3):

$$\mathrm{Asn}^{1}\ \mathrm{Asp}^{2}\ \mathrm{Glu}^{3}\ \underset{*}{\mathrm{Cys}^{4}}\ \mathrm{Glu}^{5}\ \mathrm{Leu}^{6}\ \underset{**}{\mathrm{Cys}^{7}}\ \mathrm{Val}^{8}\ \mathrm{Asn}^{9}\ \mathrm{Val}^{10}\ \mathrm{Ala}^{11}\ \underset{*}{\mathrm{Cys}^{12}}\ \mathrm{Thr}^{13}\ \mathrm{Gly}^{14}\ \underset{**}{\mathrm{Cys}^{15}}\ \mathrm{Leu}^{16}$$

y en la que entre la cisteína en la posición 4 y la cisteína en la posición 12 hay un enlace disulfuro; y entre la cisteína en la posición 7 y la cisteína en la posición 15 (SEC ID Nº: 20) hay un segundo enlace disulfuro. Se ha descubierto que este péptido tiene actividad biológica potenciada como un agonista de la producción de GMPc debido a su

constante de unión potenciada por el receptor de guanilato ciclasa, y que es superior a la uroguanilina con respecto a la temperatura y estabilidad proteasa y con respecto a su actividad biológica el intervalo de pH fisiológicamente favorable (pH de 6 a 7) en el intestino delgado.

Los agonistas del receptor de guanilato ciclasa usados en los métodos descritos anteriormente pueden administrarse por vía oral, sistémica o local. Las formas de dosificación incluyen preparaciones para inhalación o inyección, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, cápsulas, pomadas y lociones tópicas, composiciones transdérmicas, otras formulaciones peptídicas conocidas y análogos peptídicos pegilados. Una dosificación eficaz de la composición será típicamente entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 10 µg por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 10 µg a 5 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal. Los ajustes en la dosificación se realizarán usando métodos que son habituales en la técnica y dependerán de la composición particular que vaya a usarse y de aspectos clínicos. Los agonistas pueden administrarse bien como único agente activo o en combinación con otros fármacos, por ejemplo, con un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc. En todos los casos, los fármacos adicionales deberán administrarse a una dosificación que sea terapéuticamente eficaz usando, como guía, la técnica existente. Los fármacos pueden administrarse en una sola composición o secuencialmente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en diversos conceptos. El primero es que existe un mecanismo dependiente de GMPc que regula el equilibrio entre proliferación celular y apoptosis y que la reducción de los niveles de GMPc, debidos a un déficit de uroguanilina/guanilina y/o debidos a la activación de fosfodiesterasas específicas de GMPc, es una etapa temprana y crítica en la transformación neoplásica. Un segundo concepto es que la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana, que conduce a activación de cPLA2, COX-2 y posiblemente del lipoxigenasa 5 durante el proceso de inflamación, se regula negativamente mediante un mecanismo dependiente de GMPc, lo que conduce a niveles reducidos de prostaglandinas y leucotrienos, y aumenta los niveles intracelulares de GMPc que pueden por lo tanto producir una respuesta anti-inflamatoria. Además, se piensa que un mecanismo dependiente de GMPc está implicado en el control de los procesos inflamatorios. Por lo tanto, la elevación de los niveles intracelulares de GMPc puede usarse como un medio de tratamiento y control de enfermedades intestinales inflamatorias tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn e inflamación de otros órganos (por ejemplo, asociada con asma, nefritis, hepatitis, pancreatitis, bronquitis, fibrosis quística.

Sin pretender ligarse a ninguna teoría, se contempla que se puede demostrar que el transporte de iones a través de la membrana plasmática es un importante regulador del equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis estará afectado por las composiciones que alteran las concentraciones de GMPc. Se ha observado que la uroguanilina estimula el eflujo de K+, influjo de Ca++ y transporte de agua en el tracto gastrointestinal (3). Además, también se ha observado que el péptido natriurético auricular (ANP), un péptido que también se une a un receptor de guanilato ciclasa específico, induce la apoptosis en células mesangiales de rata e induce la apoptosis en miocitos cardíacos mediante un mecanismo de GMPc (26-29). Se piensa que la unión de los agonistas presentes a un receptor de guanilato ciclasa estimula la producción de GMPc. Se espera que esta interacción ligando-receptor, mediante la activación de una cascada de proteína quinasas dependientes de GMPc y CFTR, induzca entonces la apoptosis en células diana. Por lo tanto, se espera que la administración de los nuevos péptidos definidos por las SEC ID Nº: 2-21, como se muestra en las Tablas 2 y 3, o de uroguanilina, o guanilina o de péptido ST de *E. coli*, elimine, o al menos retrase, la aparición de enfermedades inflamatorias de tracto GI y la inflamación de órganos general (por ejemplo, asma, nefritis, hepatitis, pancreatitis, bronquitis, fibrosis quística.)

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para la prevención, tratamiento o retraso de la aparición de cáncer, particularmente cáncer de células epiteliales, en un sujeto administrando una composición que comprende una cantidad eficaz de un agonista del receptor de guanilato ciclasa, preferentemente un agonista del receptor de guanilato ciclasa sintético. La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de agonista para aumentar sensiblemente los niveles intracelulares de GMPc. El término "sintético" se refiere a un péptido creado para unirse a un receptor de guanilato ciclasa, pero que contiene determinadas sustituciones de las secuencias de aminoácidos que no están presentes en los agonistas de guanilato ciclasa conocidos endógenos, tales como uroguanilina. El agonista debe ser un péptido seleccionado de los definidos por las SEC ID Nº: 2-21 y que se enumeran en las Tablas 2 y 3. También se describen métodos de tratamiento de cánceres primarios, distintos de cáncer de colon, administrando una dosificación eficaz de un péptido seleccionado del grupo que consiste en: uroguanilina; guanilina; y péptido ST de *E. coli.* Para este propósito puede usarse cualquier forma conocida de uroguanilina o guanilina, aunque se prefieren los péptidos humanos.

El mecanismo dependiente de GMPc que regula el equilibrio entre la proliferación y apoptosis celular en células tumorales metastásicas puede servir como un mecanismo para el direccionamiento y tratamiento de tumores metastásicos. El hígado es el sitio más habitual de la metástasis de un cáncer colorrectal primario. Hacia fases tardías de la enfermedad, las células metastásicas colorrectales también pueden invadir otras partes del cuerpo. Es importante observar que las células metastásicas que se originan desde el sitio primario en el tracto gastrointestinal continúan típicamente expresando receptores de guanilato ciclasa y por tanto, estas células deben ser sensibles a la terapia de apoptosis mediada por receptores de guanilato ciclasa intestinales. Cuando se usan péptidos que tienen

actividad uroguanilina bien en solitario o en combinación con inhibidores específicos de GMPc-fosfodiesterasa, también retrasan la aparición de carcinogénesis en el epitelio intestinal restableciendo un equilibrio saludable entre la proliferación y apoptosis celular mediante un mecanismo mediado por GMPc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de guanilato ciclasa" se refiere a la clase de receptores de la guanilato ciclasa en cualquier tipo de célula a la cual se unen los péptidos agonistas de la invención o agonistas naturales descritos en el presente documento

Como se usa en el presente documento, la expresión "agonista de receptor de guanilato ciclasa" se refiere a péptidos y/u otros compuestos que se unen a un receptor de la guanilato ciclasa y estimulan la producción de GMPc. La expresión también incluye todos los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos sustancialmente equivalentes a al menos una parte del dominio de unión que comprende los restos de aminoácidos de 3-15 de la SEC ID Nº: 1. Esta expresión también incluye fragmentos y pro-péptidos que se unen al receptor de guanilato ciclasa y estimulan la producción de GMPc. La expresión "sustancialmente equivalente" se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos equivalente a la del dominio de unión en la que pueden eliminarse o reemplazarse determinados restos por otros aminoácidos sin afectar a la capacidad del péptido para unirse a un receptor de guanilato ciclasa y estimular la producción de GMPc.

Estrategia y diseño de nuevos agonistas del receptor de guanilato ciclasa

La uroguanilina es un péptido secretado por las células caliciformes y otras células epiteliales que recubren la mucosa gastrointestinal como pro-uroguanilina, una forma funcionalmente inactiva. El pro-péptido humano se convierte posteriormente en un péptido de 16 aminoácidos funcionalmente activo expuesto en la SEC ID Nº: 1 (la secuencia de la uroguanilina humana, véase la Tabla 2) en el lumen del intestino mediante proteasas endógenas. Dado que la uroguanilina es un péptido termo-resistente, ácido-resistente, y resistente a proteólisis, la administración oral o sistémica de este péptido y/u otros péptidos similares a la secuencia peptídica de 16 aminoácidos funcionalmente activa de la SEC ID Nº: 1, puede emplearse de un modo eficaz en métodos de tratamiento.

Más adelante se describen péptidos similares, pero distintos, a la uroguanilina, incluyendo algunos que producen propiedades potenciadoras de GMPc superiores y/u otras características beneficiosas (por ejemplo estabilidad para la temperatura mejorada, estabilidad para proteasas mejorada, o una actividad superior a un pH preferido) en comparación con los péptidos de uroguanilina anteriormente conocidos. Los péptidos pueden usarse para inhibir la inflamación GI y para el tratamiento o prevención de la aparición de formación de pólipos asociados con la inflamación intestinal. También pueden tratarse los tejidos epiteliales susceptibles a la formación de células cancerosas. Los agonistas del receptor de guanilato ciclasa descritos tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las Tablas 2 y 3. El "dominio de unión" para la interacción agonista-receptor incluye los restos de aminoácidos de 3-15 de SEC ID Nº: 1.

Se aplicó un modelo molecular al diseño de nuevos agonistas del receptor de guanilato ciclasa usando los métodos detallados en (30). Estos consistían en cálculos de energía de tres compuestos de los que se sabía que interaccionaban con los receptores de guanilato ciclasa, es decir para la uroguanilina humana, biciclo [4,12; 7,15] Asn^1-Asp^2-Asp^3-Cys^4-Glu^5-Leu^6-Cys^7-Val^8-Asn^9-Val^{10}-Ala^{11}-Cys^{12}-Thr^{13}-Gly^{14}-Cys^{15}-Leu^{16} (UG, SEC ID Nº: 1); guanilina humana, biciclo [4,12; 7,15] Pro^1-Gly^2-Thr^3-Cys^4-Glu^5-Ile^6-Cys^7-Ala^8-Tyr^9-Ala^{10}-Ala^{11}-Cys^{12}-Thr^{13}-Gly^{14}-Cys^{15} (GU, SEC ID Nº: 22); y la enterotoxina termoestable pequeña de *E. coli*, triciclo [6,10; 7,15; 11-18] Asn^1-Ser^2-Ser^3-Asn^4-Tyr^5-Cys^6-Cys^7-Glu^8-Leu^9-Cys^{10}-Cys^{11}-Asn^{12}-Pro^{13}-Ala^{14}-Cys^{15}-Thr^{16}-Gly^{17}-Cys^{18}-Tyr^{19} (ST, SEC ID Nº: 23). Se usaron comparaciones geométricas de todas las posibles conformaciones de baja energía para estos tres compuestos para revelar las estructuras en 3D comunes que servían como “moldes” para la conformación bioactiva, es decir, para la conformación presumiblemente adoptada por GU, UG y ST durante la interacción con el receptor. Esto permitió el diseño de nuevos análogos con una población conformacional significativamente aumentada de la conformación bioactiva a expensas de otras conformaciones de baja energía seleccionando sustituciones individuales para los diversos aminoácidos.

Los cálculos de energía se realizaron mediante el uso de procedimientos de construcción (30). Se usó el potencial de campo ECEPP/2 (31,32) asumiendo una geometría de valencia rígida con enlaces trans-peptídicos planares, incluyendo el de Pro^{13} en ST. Se permitió que el ángulo ω variara en Pro^{13}. Se incluyeron hidrógenos alifáticos y aromáticos generalmente incluidos en centros atómicos unitarios de tipo CH_n; se describieron explícitamente los átomos de Hα y los hidrógenos de amida.

El esquema de cálculo principal implicó diversas etapas sucesivas. En primer lugar, se consideraron las secuencias de los dos fragmentos del modelo monocíclico (tres fragmentos para ST), Ac-*ciclo* (Cys^i -...-Cys^j) -NMe, todos los restos excepto Cys, Gly y Pro estaban reemplazados por alaninas; los valores i y j corresponden a las secuencias de GU, UG y ST. En esta etapa, se consideraron todas las posibles combinaciones de mínimos locales para la estructura peptídica para cada uno de los restos de aminoácidos, es decir, el mínimo en el mapa de Ramachandran de los tipos *E, F, C, D, A y A** (de acuerdo con la notación en (33)) para el resto de Ala; de los tipos *E*, F*, C*, D*, A, E, F, C D* y *A** para el resto Gly; y de los tipos *F, C* y *A* para Pro. Para cada conformación estructural, se descubrió una posibilidad óptima para cerrar un ciclo que empleaba las funciones posibles parabólicas intrínsecas potenciales

para el campo de fuerza ECEPP comprobando un perfil de energía de rotación alrededor del ángulo diedral $\chi 1$ para el resto de D-Cys.

En total, se consideraron aproximadamente unas 180.000 conformaciones para cada uno de los restos cíclicos. Después, se seleccionaron los confórmeros que satisfacían el criterio $E - E_{min} < \Delta E = 15$ kcal/mol y se diferenciaban en más de 40° en al menos un valor de cualquier ángulo diédrico estructural (de aproximadamente 3.000 a 8.000 conformaciones para los distintos fragmentos de modelo). En la siguiente etapa, se solaparon las conformaciones seleccionadas de los fragmentos monocíclicos coincidentes para crear posibles conformaciones de los fragmentos del modelo bicíclico (los fragmentos tricíclicos en el caso de ST). Típicamente, este procedimiento produjo aproximadamente de 20.000-30.000 conformaciones. Todas estas conformaciones se sometieron a un nuevo ciclo de cálculos de energía, que dio como resultado 191 conformaciones que satisfacían el criterio $E - E_{min} < \Delta E = 20$ kcal/mol para el fragmento del modelo ST y en 6.965 conformaciones que satisfacían el mismo criterio para el fragmento del modelo GU/UG. Después de esto, se restablecieron las cadenas laterales que se habían perdido en los fragmentos de los modelos, y se realizaron los cálculos de energía de nuevo, optimizándose los valores de ángulo diédrico de los grupos de cadena lateral (excepto para el ángulo $\chi 1$ de los restos Cys) y de los grupos terminales de la estructura antes de la minimización de la energía para alcanzar sus disposiciones espaciales más favorables, empleando un algoritmo anteriormente descrito (34). Para el fragmento UG 4-15, 632 conformaciones satisficieron el criterio de $\Delta E = 20$ kcal/mol; 164 de las cuales satisficieron el criterio más riguroso de $\Delta E = 12$ kcal/mol, que corresponde al criterio aceptado de 1 kcal/mol/resto (30). Se realizó una elongación posterior del fragmento UG 4-15 a 3-16, y después de toda la molécula de UG por el mismo procedimiento de construcción. Finalmente, se descubrieron 31 conformaciones estructurales de UG que satisfacían el criterio de $\Delta E = 16$ kcal/mol.

Se realizaron comparaciones geométricas de confórmeros del siguiente modo. Se evaluó el mejor ajuste en la superposición en los centros atómicos en un par de confórmeros para comprobar el nivel de similitud geométrica entre los dos confórmeros, de acuerdo con (35). El criterio de similitud geométrica fue el valor de rms que se calculó para un par de conformaciones A y B del siguiente modo:

$$\mathbf{rms = 1/N)\ \sum^{N}i = 1\ [(x^{A}i - x^{B}i)^{2} + [(y^{A}i - y^{B}i)^{2} + [(z^{A}i - z^{B}i)^{2}]^{1/2}}$$

en el que N es el número de pares de átomos Cα seleccionados para la superposición, y x, y y z son coordenadas cartesianas. Mediante el criterio de similitud geométrica de rms < 2,0 Å, las conformaciones de baja energía del fragmento conformacional rígido UG 4-15 cayeron en siete familias conformacionales. Una de ellas consistía en los mismos seis confórmeros que son similares tanto a 1UYA como a 1ETN; esta familia contiene también el confórmero de energía más baja de UG. (1UYA y 1ETN son las estructuras en 3D definidas experimentalmente de UG y ST, respectivamente, de las que se sabe que poseen una alta actividad biológica (36,37); las estructuras en 3D estaban disponibles en el Banco de Datos de Proteínas).

Tabla 1. Los valores de los ángulos diédricos (en grados) de la estructura peptídica en la conformación "molde" de UG

		Nº de confórmeros					
Resto	Ángulo	1	3	9	22	25	27
Cys^4	Ψ	-37	-41	-40	-55	-38	-54
Glu^5	Φ	-71	-67	-72	-69	-68	-70
	Ψ	-50	-47	-48	-33	-43	-22
Leu^6	Φ	-86	-86	-85	-81	-88	-91
	Ψ	163	165	160	153	160	156
Cys^7	Φ	-79	-82	-79	-83	-79	-81
	Ψ	74	68	78	67	75	72
Val^8	Φ	-120	-114	-126	-124	-125	-128
	Ψ	-65	-57	-62	-55	-60	-64
Asn^9	Φ	-83	-95	-82	-88	-89	-82
	Ψ	119	113	134	118	111	116

		Nº de confórmeros					
Resto	Ángulo	1	3	9	22	25	27
Val^{10}	Φ	-84	-82	-97	-90	-82	-82
	Ψ	-21	-13	-16	-4	-15	-16
Ala^{11}	Φ	-79	-86	-87	-89	-85	-80
	Ψ	-32	-21	-35	-35	-18	-27
Cys^{12}	Φ	-86	-92	-78	-79	-95	-90
	Ψ	-52	-53	-55	-57	-53	-54
Thr^{13}	Φ	-129	-121	-127	119	-118	-130
	Ψ	111	153	141	155	141	119
Gly^{14}	Φ	-64	-78	-78	-80	-78	-68
	Ψ	83	64	68	62	67	78
Cys^{15}	Φ	-139	-160	-150	-156	-78	-131

Los ángulos Φ y Ψ diédricos, valores que determinan la forma en 3D general de este fragmento UG, son similares (Tabla 1). Esto permite realizar diseños preliminares de nuevos análogos que se dirigen a estabilizar esta familia particular de conformaciones empleando las limitaciones conformacionales locales conocidas impuestas por diversos tipos de aminoácidos.

Por ejemplo, se sabe que la Gly es más flexible conformacionalmente en comparación con cualquier otro resto de L-aminoácido, dado que la Gly puede adoptar conformaciones con cualquiera de las cuatro combinaciones de signos para Φ y Ψ, es decir, -, +; -, -; +, +; y +, -. La última combinación está prohibida estéricamente para los L-aminoácidos, como Ala. Por lo tanto, la sustitución de Gly^{14} por Ala^{14} debe limitar la flexibilidad conformacional en la posición 14 conservando las conformaciones descritas en la Tabla 1. También, la sustitución por Aib (α-Me-Ala, di-α-metil-alanina) debe limitar la flexibilidad conformacional local únicamente mediante dos regiones, es decir, para -, - y +, +, siendo la primera compatible con los confórmeros de Ala^{11} en la Tabla 1. Por lo tanto, una sustitución más deseable es Aib^{11}. En la Pro, el valor de Φ se fija a -75°; este resto es también similar a la valina por sus propiedades hidrófobas. Por lo tanto, la Val^{10} puede reemplazarse por Pro^{10}, que añade más limitaciones conformacionales locales a los confórmeros de UG en la Tabla 1. El reemplazo por Pro también requiere que el resto anterior posea solamente valores de Ψ positivos; la Asn^{9} en la Tabla 1 cumple este requisito. El resto Pro ya existe en la posición correspondiente de ST. Todas las sustituciones sugeridas dentro de la SEC ID Nº: 1 mostradas más adelante (por ejemplo, Pro^{10}, Aib^{11} o Ala^{14}) no cambian la naturaleza química de los aminoácidos no alifáticos (tales como Asn, Asp o Thr), lo cual puede ser importante para la interacción real con el receptor. Las sustituciones anteriores deben conducir únicamente a limitaciones conformacionales que modifican el equilibrio conformacional en UG hacia la forma “molde” en 3D sugerida.

Basándose en las estructuras en 3D definidas en la Tabla 1, se definió un farmacóforo tridimensional para la uroguanilina, lo que permitió la determinación de las distancias entre los grupos funcionales de uroguanilina de los que se cree que interaccionan directamente con el receptor. Esos grupos de los que se cree que interaccionan directamente con el receptor son grupos de restos laterales en las posiciones 3, 5, 9 y 13 de la secuencia estructural. Preferentemente, los restos son Glu3, Glu5, Asn9, y Thr13, como se muestra en SEC ID Nº: 2 y SEC ID Nº: 20. Por tanto, se describe un farmacóforo tridimensional de uroguanilina en el que la disposición espacial de las cuatro cadenas laterales de los restos en las posiciones 3, 5, 9 y 13 pueden crearse de tal manera que las distancias entre estas cadenas laterales permiten una actividad biológica opcional. Esas distancias (medidas como distancias entre los átomos Cβ de los restos correspondientes) son las siguientes: de 5,7 a 7,6 Å para la distancia 3-5, de 4,0 a 6,0 Å para 3-9; de 7,7 a 8,3 Å para 3-13, de 9,4 a 9,5 Å para 5-9, de 9,4 a 9,5 Å para 5-13, y de 5,8 a 6,3 Å para 9-13.

Las distancias anteriores dependen solamente de las conformaciones de la estructura peptídica. En algunos casos, sin embargo, las conformaciones de las cadenas laterales en sí mismas son también importantes. Por ejemplo, los cálculos mostraron que no hay diferencia conformacional entre las estructuras de UG (SP301), [Glu^{2}]-UG (SP303), [Glu^{3}]-UG (SP304) y [Glu^{2}, Glu^{3}]-UG (SP302) en cuanto a sus conformaciones de baja energía. Sin embargo, existe una diferencia distinta en las posiciones espaciales del β-carboxilo de Asp y de los γ-carboxilos de Glu en la posición 3. Es decir, los γ-carboxilos de los restos Glu en la posición 3 están claramente extendidos "hacia afuera" de la

mayoría de las moléculas a mayor distancia que los β-carboxilos correspondientes de los restos Asp. La observación anterior sugiere contundentemente que el grupo carboxilo cargado negativamente de la cadena lateral en la posición 3 interacciona específicamente con un sitio de unión cargado positivamente en el receptor; por lo tanto, los análogos que contienen Glu3 en lugar de Asp3 deben ser más activos. Al mismo tiempo, para garantizar la eficacia de esta interacción particular, debe equilibrarse bien un sistema entero de interacciones electrostáticas de largo alcance entre el ligando y el receptor. Dado que la cadena lateral Glu^2 presenta más posibilidades conformacionales en comparación con la cadena lateral Asp^2, este equilibrio puede cambiar ligeramente en SP302 (doble sustitución de Asp por Glu) en comparación con SP304 (una sola sustitución de Asp^3 por Glu^3).

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

Tabla 2

1. Compuesto parental: uroguanilina

SEC ID Nº: 1

Asn^1-Asp^2-Asp^3-Cys^4-Glu^5-Leu^6-Cys^7-Val^8-Asn^9-Val^{10}-Ala^{11}-Cys^{12}-Thr^{13}-Gly^{14}-Cys^{15}-Leu^{16}

2. Compuestos sin modificaciones de cisteínas:

Secuencia común (SEC ID Nº: 2):

Asn^1-$\mathbf{Aaa^2}$-$\mathbf{Bbb^3}$-Cys^4-Glu^5-Leu^6-Cys^7-Val^8-Asn^9-$\mathbf{Xxx^{10}}$-$\mathbf{Yyy^{11}}$-Cys^{12}-Thr^{13}-$\mathbf{Zzz^{14}}$-Cys^{15}-Leu^{16}

en la que Aaa = Asp, Glu; Bbb = Asp, Glu
con la excepción de que en la misma molécula Aaa y Bbb no sean ambos Asp
Y en la que Xxx = Val, Pro; Yyy = Ala, Aib; Zzz = Gly, Ala

3. Compuestos con mercaptoprolina (Mpt) sustituida por cisteína en la posición 7:

Secuencia común (SEC ID Nº: 3):

Asn^1-$\mathbf{Aaa^2}$-$\mathbf{Bbb^3}$-Cys^4-Glu^5-Leu^6-$\mathbf{Mpt^7}$-Val^8-Asn^9-$\mathbf{Xxx^{10}}$-$\mathbf{Yyy^{11}}$-Cys^{12}-Thr^{13}-$\mathbf{Zzz^{14}}$-Cys^{15}-Leu^{16}

en la que Aaa = Asp, Glu; Bbb = Asp, Glu
en la que Xxx = Val, Pro; Yyy = Ala, Aib; Zzz = Gly, Ala

4. Compuestos con penicilaminas (β, β-dimetilcisteínas, Pen) sustituidas por cisteínas:

Secuencia común (SEC ID Nº: 4):

Asn^1-$\mathbf{Aaa^2}$-$\mathbf{Bbb^3}$-$\mathbf{Kkk^4}$-Glu^5-Leu^6-$\mathbf{Lll^7}$-Val^8-Asn^9-$\mathbf{Xxx^{10}}$-$\mathbf{Yyy^{11}}$-$\mathbf{Mmm^{12}}$-Thr^{13}-$\mathbf{Zzz^{14}}$-$\mathbf{Nnn^{15}}$-Leu^{16}

en la que Aaa = Asp, Glu; Bbb = Asp, Glu
en la que Xxx = Val, Pro; Yyy = Ala, Aib; Zzz = Gly, Ala
y Kkk, Lll, Mmm y Nnn no son ni Cys ni Pen (salvo que en el mismo confórmero no todos sean Cys)

5. Compuestos con puentes de lactama sustituidos por puentes disulfuro:

Secuencia común (SEC ID Nº: 5):

Asn^1-$\mathbf{Aaa^2}$-$\mathbf{Bbb^3}$-$\mathbf{Kkk^4}$-Glu^5-Leu^6-$\mathbf{Lll^7}$-Val^8-Asn^9-$\mathbf{Xxx^{10}}$-$\mathbf{Yyy^{11}}$-$\mathbf{Mmm^{12}}$-Thr^{13}-$\mathbf{Zzz^{14}}$-$\mathbf{Nnn^{15}}$-Leu^{16}

en la que Aaa = Asp, Glu; Bbb = Asp, Glu
en la que Xxx = Val, Pro; Yyy = Ala, Aib; Zzz = Gly, Ala;
y todas las combinaciones de lo siguiente (Dpr es ácido diaminopropiónico):

Kkk es Dpr y Mmm es Asp o Glu;
Kkk es Asp o Glu y Mmm es Dpr;
Lll es Cys o Pen;
Nnn es Cys o Pen;

o:

Lll es Dpr y Nnn es Asp o Glu;
Lll es Asp o Glu, y Nnn es Dpr;
Kkk es Cys o Pen;
Mmm es Cys o Pen.

Algunos de los péptidos mostrados en la Tabla 2 contienen 16 restos de aminoácidos en los que los restos de cisteína forman puentes disulfuro entre Cys^4 y Cys^{12}, y Cys^7 y Cys^{15}, respectivamente. Estos péptidos difieren de las secuencias peptídicas descritas en el documento WO 01/25266, y se diseñan basándose en la conformación del péptido y en los cálculos de energía.

Además, los péptidos, que varían en longitud de 13 a 16 aminoácidos, mostrados en la Tabla 3, se diseñan basándose en los cálculos de energía y en las estructuras tridimensionales, para promover la estabilización del confórmero biológicamente activo y minimizar o eliminar la interconversión a confórmeros biológicamente inactivos . Estos péptidos también se diseñan para promover la estabilidad frente a la proteólisis y a temperaturas más altas. El diseño de estos péptidos implica modificaciones de restos de aminoácidos que contienen cargas iónicas a valores de pH más bajos, tales como ácidos glutámico y aspártico.

Tabla 3

SEC ID Nº:6	X1 Glu Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:7	X1 Glu Asp Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:8	X1 Asp Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:9	X1 Asp Asp Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:10	X1 Glu Glu Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:11	X1 Asp Glu Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:12	X1 Glu Asp Cys X2 X3 Cys X4 Tyr X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:13	X1 Asp Asp Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:14	X1 Glu Glu Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:15	X1 Asp Glu Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:16	X1 Glu Asp Cys X2 X3 Cys X4 Gln X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:17	Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9
SEC ID Nº:18	Glu Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys
SEC ID Nº:19	**X1 Gly Cys X2 X3 Cys X4 Asn X5 X6 Cys X7 X8 Cys X9**
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
SEC ID Nº:20	Asn Asp Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu
SEC ID Nº:21	**Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu**
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

X1 a X9 puede ser cualquier aminoácido. Los puentes disulfuro se forman entre restos de Cys en la posición 4 y 12 y entre los de la posición 7 y 15, respectivamente. La SEC ID Nº: 18 representa el requisito de longitud mínima para que estos péptidos se unan al receptor de guanilato ciclasa

Composiciones y formulaciones farmacéuticas

Los agonistas del receptor de guanilato ciclasa de la presente invención (Tabla 2; SEC ID Nº: 2-5 y Tabla 3; SEC ID Nº: 6-21), así como la uroguanilina, guanilina y/o enterotoxina ST bacteriana, pueden combinarse o formularse con diversos excipientes, vehículos o adyuvantes para la administración oral, local o sistémica. Las composiciones peptídicas pueden administrarse en soluciones, polvos, suspensiones, emulsiones, comprimidos, cápsulas, parches transdérmicos, pomadas u otras formulaciones. Las formulaciones y formas de dosificación pueden realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., A. Oslo ed., Easton, PA (1980)).

Los inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de GMPc pueden ser moléculas pequeñas, péptidos, proteínas u otros compuestos que impiden específicamente la degradación del GMPc. Los compuestos inhibidores incluyen sulindac sulfona, zaprinast, motapizona y otros compuestos que bloquean la actividad enzimática de las fosfodiesterasas específicas de GMPc. Uno o más de estos compuestos puede combinarse con un agonista del receptor de guanilato ciclasa ilustrado en las SEC ID Nº: NO: 2-21, uroguanilina, guanilina y péptido ST de *E. coli*.

La selección de transportadores (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato o PBS) y otros componentes adecuados para su uso en las composiciones entra bien dentro del nivel de experiencia en esta técnica. Además de contener uno o más agonistas del receptor de guanilato ciclasa, dichas composiciones pueden incorporar transportadores farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes de los que se sabe que facilitan la administración y/o potencian la captación. También pueden usarse otras formulaciones, tales como microesferas, nanopartículas, liposomas, proteínas o péptidos pegilados y sistemas basados en inmunología. Los ejemplos incluyen formulaciones que emplean polímeros (por ejemplo, polietilenglicol al 20 % p/v) o celulosa, o formulaciones

entéricas y análogos peptídicos pegilados para aumentar la semivida sistémica y la estabilidad.

Métodos de tratamiento

El término "tratamiento" se refiere a reducir o aliviar síntomas en un sujeto, a la prevención de síntomas, del empeoramiento o progresión, o prevención del desarrollo de una enfermedad. Para un sujeto dado, puede determinarse una mejora en un síntoma, su empeoramiento, regresión o progresión mediante cualquier medición objetiva o subjetiva típicamente empleada por un experto en la materia. La eficacia del tratamiento en el caso del cáncer puede medirse como una mejora en la morbilidad o mortalidad (por ejemplo, prolongando la curva de supervivencia de una población seleccionada). Por tanto, el tratamiento eficaz incluiría la terapia de enfermedades existentes, control de enfermedades reduciendo o deteniendo su progresión, prevención de aparición de la enfermedad, reducción en el número o gravedad de los síntomas o una combinación de los mismos. El efecto puede mostrarse en un estudio controlado usando uno o más criterios estadísticamente significativos.

La terapia combinada con uno o más procedimientos médicos/quirúrgicos y/o al menos un agente quimioterapéutico distinto puede practicarse con la invención. Otros agentes adecuados útiles en la terapia combinada incluyen fármacos anti-inflamatorios tales como, por ejemplo, esteroides o fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), tales como aspirina y similar. Los métodos profilácticos para la prevención o reducción de la incidencia de recaídas también se consideran tratamiento.

Los cánceres que se espera que respondan a las composiciones incluyen carcinoma mamario, colorrectal, de pulmón, de ovario, pancreático, prostático, renal, de estómago, de vejiga, de hígado, esofágico y testicular. Ejemplos adicionales de enfermedades que implican tejidos cancerosos o precancerosos que deberían responder a un agente terapéutico que comprende al menos un agonista de receptor de guanilato ciclasa incluyen: carcinoma (por ejemplo de células basales, basoescomoso, Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, *in situ*, de Krebs, de células de Merkel, pulmonar microcítico o no microcítico, de células de avena, papilar, bronquiolar, de células escamosas, de células transicionales, de Walker), leucemia (por ejemplo, de linfocitos B, linfocitos T, HTLV, linfocítico crónico o agudo, de mastocitos, mieloide), histiocitoma, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, plasmacitoma, reticuloendoteliosis, adenoma, adeno-carcinoma, adenofibroma, adenolinfoma, ameloblastoma, angioqueratoma, hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, apudoma, branquioma, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoidea, carcinosarcoma, cementoma, colangioma, colesteatoma, condrosarcoma, condroblastoma, condrosarcoma, cordoma, coristoma, craneofaringioma, condroma, cilindroma, cistoadenocarcinoma, cistoadenoma, cistosarcoma filodes, disgerminoma, ependimoma, sarcoma de Ewing, fibroma, fibro-sarcoma, tumor de células gigantes, ganglioneuroma, glioblastoma, glomangioma, tumor de células granulosas, ginandroblastoma, hamartoma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, hepatoma, tumor de células de islotes, sarcoma de Kaposi, leiomioma, leiomiosarcoma, leucosarcoma, tumor de células de Leydig, lipoma, liposarcoma, linfangioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma, meduloblastoma, meningioma, mesenquimoma, mesonefroma, mesotelioma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, mixoma, mixosarcoma, neurilemoma, neuroma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neurofibromatosis, odontoma, osteoma, osteosarcoma, papiloma, paraganglioma, paraganglioma no cromafín, pinealoma, rabdomioma, rabdomiosarcoma, tumor de células de Sertoli, teratoma, tumor de células tecales, y otras enfermedades en las que las células se han vuelto displásicas, inmortalizadas o transformado.

Puede administrarse un bolo de la composición de la invención a lo largo de un periodo de tiempo corto. Una vez al día es un régimen de dosificación conveniente para tratar, entre otras, algunos de los estados patológicos mencionados anteriormente. Como alternativa, la dosis diaria eficaz puede dividirse en dosis múltiples para los fines de administración, por ejemplo, de dos a doce dosis al día. El nivel de dosis seleccionado para su uso dependerá de la biodisponibilidad, actividad y estabilidad del compuesto, de la vía de administración, de la gravedad de la enfermedad que vaya a tratarse, y de la afección del sujeto que requiere el tratamiento. Se contempla que una dosificación diaria será típicamente de entre 10 µg y aproximadamente 2 mg (por ejemplo, de aproximadamente 100 µg a 1 mg) del compuesto por kilogramo de peso corporal. La cantidad de compuesto administrada depende de factores conocidos por una persona experta en la materia, tales como, por ejemplo, las propiedades químicas del compuesto, vía de administración, localización y tipo de cáncer y similares. El sujeto mamífero puede ser cualquier animal o un paciente humano. Por tanto, se contemplan tanto los tratamientos veterinarios como médicos de acuerdo con la invención.

La invención se describirá ahora adicionalmente a través de los ejemplos no limitativos.

Ejemplo

Materiales y Métodos

Cultivo celular: se obtuvieron células T84 de carcinoma de colon humano de la American Type Culture Collection de pase 52. Las células crecieron en una mezcla 1:1 de medio de Ham F-12 y medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10 %, 100 U de penicilina/ml, y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células se alimentaron con medio reciente cada tres días y se dividieron a una confluencia de aproximadamente el

80 %.

Ensayo basado en células T84 para determinar los niveles intracelulares de GMPc: los análogos peptídicos se sintetizaron a medida mediante Multiple Peptide Systems, San Diego, CA., y de Princeton Biomolecules, Langhorne, PA. La actividad biológica de los péptidos sintéticos se analizó como se ha indicado anteriormente (15). En resumen, las monocapas confluentes de células T-84 en placas de 24 pocillos se lavaron dos veces con 250 µl de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4), se pre-incubaron a 37 °C durante 10 min con 250 µl de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) e isobutilmetilxantina (IBMX) 1 mM, seguido por incubación con análogos peptídicos (de 0,1 nM a 10 µM) durante 30 min. Se aspiró el medio, y la reacción se finalizó mediante la adición de ácido perclórico al 3 %. Después de la centrifugación y neutralización con NaOH 0,1 N, se usó el sobrenadante directamente para las mediciones de GMPc usando un kit de ELISA (Caymen Chemical, Ann Arbor, MI.).

Resultados

Los péptidos mostrados en la Tabla 4 se sintetizaron a de forma personalizada y se purificaron (pureza > 95 %) usando un procedimiento publicado (38). Los análogos peptídicos se evaluaron en el ensayo basado en células T84 con respecto a su capacidad para potenciar los niveles intracelulares de GMPc. Como se muestra en la Tabla 4, SP304 (SEC ID Nº: 20) dio la mejor potenciación del GMPc intracelular de todos los análogos ensayados. SP316 (SEC ID Nº: 21) fue el segundo en eficacia, mientras que las actividades biológicas de SP301, SP302 y SP303 fueron algo más débiles. Los análogos peptídicos SP306 y SP310 no fueron activos en este ensayo. Estos resultados indican que SP304 es el péptido más fuerte para potenciar el GMPc. Estos resultados también sugieren que el resto de cisteína en la posición 7 no puede sustituirse con penicilamina como un componente del enlace disulfuro [7,15] y que el resto Asn 13 en la posición 9 no puede cambiarse por una Gln.

Tabla 4: Agonistas peptídicos evaluados con respecto a la actividad biológica en el bioensayo de células T84

SEC ID Nº:*	Código de Compuesto	Nivel de GMPc** (pmol/pocillo)
1	SP 301	205
6	SP 302	225
7	SP 303	195
20	SP 304	315
14	SP 306	0
4	SP 310	0
21	SP 316	275

* Las SEC ID para SP301, SP304 y SP316 son las secuencias de aminoácidos exactas para estos análogos como se proporciona en el texto.

** Se observó un nivel de GMPc intracelular en células T84 después del tratamiento con una solución 1 micromolar del agonista peptídico respectivo durante 30 minutos. El valor observado para S304 fue estadísticamente significativo con un valor de p > 0,5.

Para examinar la estabilidad térmica, se calentaron soluciones 10 micromolar de análogos peptídicos a 95 °C durante hasta 90 minutos. A tiempos específicos durante el tratamiento, las muestras se ensayaron con respecto a su eficacia biológica en el ensayo basado en células-T84. La actividad biológica de la SP301, SP302, SP303 y SP304 no cambió significativamente después de 60 minutos de calentamiento. Después de 90 minutos, las actividades de SP301, SP302 y SP303 se redujeron a aproximadamente el 80 % de sus valores originales, mientras que la actividad biológica de SP304 permaneció inalterada. Esto indica que SP304 es más estable a la termodesnaturalización en comparación con otros péptidos ensayados. Basándose en cálculos de energía y en la estructura en 3D, se esperaba que el grupo carboxilo cargado negativamente de la cadena lateral en la posición 3 de la SEC ID Nº: 1 interaccionase específicamente con un sitio de unión cargado positivamente en el receptor. En caso de que pueda potenciarse esta interacción, los análogos que contiene Glu3 en lugar de Asp3 deberían ser más activos, como se descubrió en el caso de SP304. Al mismo tiempo, para garantizar la eficacia de esta interacción particular, se debe equilibrar bien un sistema completo de interacciones electrostáticas de amplio alcance entre ligando y receptor. Dado que la cadena lateral Glu^2 presenta más posibilidades conformacionales en comparación con la cadena lateral Asp^2, este equilibrio puede cambiar ligeramente en SP302 (sustitución doble de Asp por Glu) en comparación con SP304 (una sola sustitución de Asp^3 por Glu^3). De hecho, la actividad biológica de SP304 es la mejor entre los análogos evaluados.

Los péptidos sintéticos SP301, SP302, SP303 y SP304 también se ensayaron con respecto a sus actividades a distintos valores de pH del ensayo basado en células-T84. Mientras que todos de estos péptidos mostraron una producción intracelular potenciada de GMPc a un pH que variaba de 5 a 7, SP304 mostró la mayor potenciación en el intervalo entre 6,5 y 7. Es importante observar que el pH fisiológico del intestino grueso está en un intervalo similar y por lo tanto, debe esperarse que SP304 sea específicamente eficaz para el tratamiento del cáncer de colon.

También se evaluaron péptidos usados bien en solitario o en combinación con inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de GMPc (por ejemplo, zaprinast o sulindac sulfona) en ensayos basados en células T84 para la potenciación de los niveles intracelulares de GMPc. Las combinaciones de un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc con SP304 presentaron un efecto drástico en la potenciación de los niveles de GMPc en estos experimentos. El péptido sintético SP304 aumentó sustancialmente el nivel del GMPc por encima del nivel alcanzado en presencia de zaprinast o solamente sulindac sulfona. El tratamiento de los pocillos con SP304 en combinación bien con zaprinast o sulindac sulfona dio como resultado aumentos sinérgicos en los niveles intracelulares de GMPc. Estos aumentos fueron estadísticamente significativos, con valores de p de < 0,5. Estos datos indican que los tratamientos que combinan un agonista peptídico de un receptor de guanilato ciclasa con uno o más inhibidores de fosfodiesterasa dependientes de GMPc dan como resultado un aumento mayor que el aditivo en concentraciones de GMPc.

Referencias

1. Currie, *et al.*, Proc. Nat'l Acad Sci. EE.UU. 89:947-951 (1992).

2. Hamra, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 90:10464-10468 (1993).

3. Forte, L., Reg. Pept. 81:25-39 (1999).

4. Schulz, *et al.*, Cell 63:941-948 (1990).

5. Guba, *et al.*, Gastroenterology 111:1558-1568 (1996).

6. Joo, *et al.*, Am. J. Physiol. 274:G633-G644 (1998).

7. Evan, *et al.*, Nature (London) 411:342-348 (2001).

8. Eastwood, G., J. Clin. Gastroenterol. 14:S29-33 (1992).

9. Lipkin, M. Arch. Fr. Mal. Appl Dig. 61:691-693 (1972).

10. Wong, *et al.*, Gut 50:212-217 (2002).

11. Potten, *et al.*, Stem Cells 15:82-93.

12. Basoglu, *et al.*, en: Procedimientos del 2º congreso de la FEBS, del 29 de junio al 4 de julio de 1999, Praga, República Checa, http://www.lf2.cuni.cz/physiolres/feps/basoglu.htm.

13. Sindic, *et al.*, J. Biol. Chem.11 de marzo de 2002, manuscrito M110627200 (en prensa*).*

14. Zhang, *et al.*, Science 276:1268-1272 (1997).

15. Shailubhai, *et al.*, Cancer Res. 60:5151-5157 (2000).

16. Shailubhai, *et al.*, en: Proceedings of the 1999 AACR NCI·EORTC. International Conference. Nov. 1999, Abstract Nº 0734.

17. Cohen, *et al.*, Lab. Invest. 78:101-108 (1998).

18. Sciaky, *et al.*, Genomics 26:427-429 (1995).

19. Whitaker, *et al.*, Genomics 45:348-354 (1997).

20. Leister, *et al.*, Cancer Res. 50:7232-7235 (1990).

21. Cheng, *et al.*, Cell 63:827-834 (1990).

22. Welsh, *et al.*, Cell 73:1251-1254 (1993).

23. Weber, *et al.*, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 281(1):L71-78 (2001).

24. Venkatakrishnan, *et al.*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 23(3):396-403 (2000).

25. Hudson, *et al.*, Free Radic. Biol. Med. 30:1440-1461 (2001).

26. Bhakdi, *et al.*, Infect. Immun. 57:3512-3519 (1989).

27. Hughes, *et al.*, J. Biol. Chem. 272:30567-30576 (1997).

28. Cermak, *et al.*, Pflugers Arch, 43:571-577 (1996).

29. Wu, *et al.*, J. Biol. Chem. 272:14860-14866 (1997).

30. Nikiforovich, G., Int. J. Pept. Prot. Res. 44:513-531 (1994).

31. Dunfield, *et al.*, J. Phys. Chem. 82:2609-2616 (1978).

32. Nemethy, *et al.*, J. Phys. Chem. 87:1883-1887 (1983).

33. Zimmerman, *et al.*, Biopolymers 16:811-843 (1977).

34. Nikiforovich, *et al*, Biopolymers 31:941-955 (1991).

35. Nyburg, S., Acta Crystallographica B30 (parte 1):251-253 (1974).

36. Chino, *et al.*, FEBS Letters 421:27-31 (1998).

37. Schulz, *et al.*, J. Peptide Res. 52:518-525 (1998).

38. Klodt, *et al.*, J. Peptide Res. 50:222-230 (1997).

39. Shailubhai, I., Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 5:261-268 (2002).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SYNERGY PHARMACEUTICALS

<120> AGONISTAS DEL RECEPTOR DE GUANILATO CICLASA PARA EL TRATAMIENTO DE INFLAMACION TISULAR Y CARCINOGÉNESIS.

<130> 33357-503D01EP

<140> PCT/US02/09551
<141> 28-03-2002

<150> 60/279.438
<151> 29-03-2001

<150> 60/279.437
<151> 29-03-2001

<150> 60/300.850
<151> 27-06-2001

<150> 60/303.806
<151> 10-07-2001

<150> 60/307.358
<151> 25-07-2001

<150> 60/348.646
<151> 17-01-2002

<160> 23

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

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

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

<400> 1

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

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (11)
<223> Ala o Aib

<220>
<221> MOD RES
<222> (14)
<223> Gly o Ala

<400> 2

```
Asn Xaa Xaa Cys Glu Leu Cys Val Asn Xaa Xaa Cys Thr Xaa Cys Leu
  1               5                  10                  15
```

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> Mpt

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

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

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

<400> 3

```
Asn Xaa Xaa Cys Glu Leu Xaa Val Asn Xaa Xaa Cys Thr Xaa Cys Leu
1               5                   10                  15
```

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

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

<220>

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

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Cys o Pen

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (11)
<223> Ala o Aib

<220>
<221> MOD RES
<222> (12)
<223> Cys o Pen

<220>
<221> MOD RES
<222> (14)
<223> Gly o Ala

<220>
<221> MOD RES
<222> (15)
<223> Cys o Pen

<400> 4

```
Asn Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa Val Asn Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Leu
  1               5                  10                  15
```

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (3)
<223> Asp o Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Dpr, Cys, Pen, Asp o Glu

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (11)
<223> Ala o Aib

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

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

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

<400> 5

```
Asn Xaa Xaa Xaa Glu Leu Xaa Val Asn Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Leu
  1               5                  10                  15
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 6

```
Xaa Glu Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
  1               5                  10                  15
```

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

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

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

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

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

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

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

<223> Cualquier aminoácido

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

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

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

<400> 7

```
Xaa Glu Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
  1               5                  10                  15
```

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES

<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 8

Xaa Asp Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 9

Xaa Asp Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

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

<220>

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 10

```
Xaa Glu Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
  1               5                  10                  15
```

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 11

```
Xaa Asp Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
  1               5                   10                  15
```

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (10)..(11)

<223> Cualquier aminoácido

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 12

Xaa Glu Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 13

Xaa Asp Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 14

Xaa Glu Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 15

```
Xaa Asp Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
 1               5                  10                  15
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (16)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 16

```
Xaa Glu Asp Cys Xaa Xaa Cys Xaa Gln Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
  1               5                  10                  15
```

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (11)..(12)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 17

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (3)..(4)
<223> Cualquier aminoácido

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (8)..(9)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD RES
<222> (11)..(12)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 18

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

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

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

<220>
<221> ENLACE DISULFURO
<222> (3)..(11)

<220>
<221> ENLACE DISULFURO
<222> (6)..(14)

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

<220>
<221> MOD RES
<222> (4)..(5)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(10)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(13)
<223> Cualquier aminoácido

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

<400> 19

```
Xaa Glu Cys Xaa Xaa Cys Xaa Asn Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
  1               5                  10                  15
```

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

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

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

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

<400> 20

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

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

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

<400> 21

```
Glu Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu
 1               5                  10
```

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

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

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

<400> 22

```
Pro Gly Thr Cys Glu Ile Cys Ala Tyr Ala Ala Cys Thr Gly Cys
 1               5                  10                  15
```

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<220>
<221> ENLACE DISULFURO
<222> (6)..(10)

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

<220>
<221> ENLACE DISULFURO
<222> (11)..(18)

<400> 23

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

Las realizaciones de la divulgación incluyen:

1. Un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID Nº: 2-SEC ID Nº: 21.

2. El péptido de la realización 1, en el que dicho péptido es un biciclo (4,12; 7,15) que tiene la secuencia de SEC ID Nº: 20.

3. El péptido de cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID Nº: 2 - SEC ID Nº: 21.

4. Un método para prevenir o tratar cáncer primario o metastásico o pólipos en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una dosificación eficaz de un agonista del receptor de guanilato ciclasa que tiene la secuencia de una cualquiera de SEC ID Nº: 2 - SEC Nº: 21.

5. Un método para tratar cáncer metastásico en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una dosificación eficaz de un agonista del receptor de guanilato ciclasa seleccionado del grupo que consiste en: uroguanilina; guanilina y péptido ST de *E. coli*.

6. Un método para tratar en un paciente cánceres primarios distintos de cáncer de colon, que comprende administrar a dicho paciente una dosificación eficaz de un agonista del receptor de guanilato ciclasa seleccionado del grupo que consiste en: uroguanilina; guanilina y péptido ST de *E. coli*.

7. El método de la realización 4, en el que dicho péptido es un péptido bicíclico (4, 12; 7, 15) que tiene la secuencia de SEC ID Nº: 20.

8. El método de la realización 4, en el que dicho cáncer primario es un miembro seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, colon, recto, pulmón, ovario, páncreas, vejiga urinaria, próstata, riñón o testículo.

9. El método de una cualquiera de las realizaciones 4-8, que adicionalmente comprende administrar a dicho paciente una dosis eficaz de un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc, de manera simultánea o secuencial, con dicho agonista del receptor de guanilato ciclasa.

10. Un método para tratar a un paciente de cáncer de colon o pólipos que comprende administrar a dicho paciente una dosis eficaz de un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc, de manera simultánea o secuencial, con uroguanilina, guanilina, o péptido ST de *E. coli*.

11. El método de la realización 9 y 10, en el que dicho inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc se selecciona del grupo que consiste en sulindac sulfona, zaprinast y motapizona.

12. Un método para prevenir o tratar inflamación en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una dosificación eficaz de un agonista del receptor de guanilato ciclasa que tiene la secuencia de una cualquiera de: SEC ID Nº: 2 – SEC ID NO: 21, uroguanilina; guanilina o péptido ST de *E. coli*.

13. El método de la realización 12, en el que dicho péptido es un péptido bicíclico (4,12; 7,15) que tiene la secuencia de SEC ID Nº: 20.

14. El método de la realización 12, en el que dicha inflamación es una enfermedad inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en: asma; nefritis, hepatitis, pancreatitis, bronquitis y fibrosis quística.

15. El método de la realización 12, en el que dicho paciente se trata de un trastorno inflamatorio del tracto gastrointestinal.

16. El método de la realización 15, en el que dicho trastorno inflamatorio del tracto gastrointestinal es una enfermedad inflamatoria intestinal seleccionada del grupo que consiste en: colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

17. El método de la realización 12, que adicionalmente comprende administrar a dicho paciente una dosis eficaz de un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc, de manera simultánea o secuencial, con dicho agonista del receptor de guanilato ciclasa.

18. El método de la realización 17, en el que dicha fosfodiesterasa dependiente de GMPc se selecciona del grupo que consiste en sulindac sulfona, zaprinast y motapizona.

19. Un método para tratar a un paciente de cáncer primario o metastásico, de pólipos o de inflamación que comprende administrar a dicho paciente:

a) un péptido agonista del receptor de guanilato ciclasa que tiene la secuencia de una cualquiera de: SEC ID Nº: 2-21; uroguanilina, guanilina o péptido ST de *E. coli*; y

b) al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc; un agente antiinflamatorio; un agente antivírico; y un agente anticanceroso;

en el que cada uno de dicho agonista del receptor de guanilato ciclasa y dicho compuesto, se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

20. Una composición farmacéutica en forma de dosis unitaria que comprende un péptido agonista del receptor de guanilato ciclasa que tiene la secuencia de una cualquiera de SEC ID Nº: 2-21 presente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

21. Una composición farmacéutica en forma de dosis unitaria que comprende:

a) un péptido agonista del receptor de guanilato ciclasa que tiene la secuencia de una cualquiera de: SEC ID Nº: 2-21; uroguanilina, guanilina o péptido ST de *E. coli*; y

b) al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc; un agente antiinflamatorio; un agente antivírico; y un agente anticanceroso;

en el que cada uno de dicho agonista del receptor de guanilato ciclasa y dicho compuesto, se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

22. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones 20 o 21, en la que la forma de dosis unitaria se selecciona del grupo que consiste en un comprimido, una cápsula, una solución o una formulación por inhalación.

23. La composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones 20 o 21, que comprende adicionalmente uno o más excipientes.

24. Un método para inducir apoptosis en las células de un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un péptido agonista que tiene la secuencia de una cualquiera de SEC ID Nº: 2 - SEC ID Nº: 21.

25. Un método para inducir apoptosis en las células de un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de uroguanilina, guanilina o péptido ST de *E. coli* para cánceres distintos de cáncer de colon.

26. Un conjugado peptídico que comprende polietilenglicol (PEG) unido a un péptido que tiene la secuencia de cualquiera de: SEC ID Nº: 2-SEC ID Nº: 21; uroguanilina; guanilina o un péptido ST de *E. Coli*.

27. Un método para tratar cáncer, inflamación o pólipos en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado peptídico de la realización 26.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en SEC ID Nº: 20 cuyo péptido es un biciclo [4, 12; 7, 15] para su uso en terapia para potenciar la producción intracelular de GMPc.

2. Un péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha potenciación de la producción intracelular de GMPc activa al regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) lo que conduce a la estimulación del sodio y a la secreción de agua en el lumen intestinal.

3. El péptido para el uso de la reivindicación 1 o 2, que adicionalmente comprende una dosis eficaz de un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc para la administración simultánea o secuencial con dicho péptido.

4. El péptido para el uso de la reivindicación 3, en el que dicho inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc se selecciona del grupo que consiste en sulindac sulfona, zaprinast y motapizona.

5. El péptido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho péptido es un polvo.