

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 828**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2009 PCT/US2009/050855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO2010009319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2009 E 09790536 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2321341**

54 Título: **Agonistas de la guanilato ciclasa útiles para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, inflamación, cáncer y otros**

30 Prioridad:

**16.07.2008 US 81289 P**

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

**17.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHAILUBHAI, KUNWAR**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 624 828 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 de la guanilato ciclasa útiles para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, inflamación, cáncer y otros

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso terapéutico de agonistas de la guanilato ciclasa C (GC-C) como un medio para potenciar la producción intracelular de GMPc. Los agonistas pueden utilizarse ya sea solos o en combinación con inhibidores de la fosfodiesterasa GMPc específica, para prevenir o tratar la inflamación, el cáncer y otros trastornos, en particular del tracto gastrointestinal y el pulmón.

10

**Antecedentes de la invención**

La uroguanilina, la guanilina y los péptidos ST (sigla del inglés *stable toxin*: enterotoxinas termoestables) bacterianos son péptidos estructuralmente relacionados que se unen a un receptor guanilato ciclasa y estimulan la producción intracelular de la guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (1-6). Esto da como resultado la activación del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, sigla del inglés *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), un canal de la membrana apical para la salida de cloruro de los enterocitos que recubren el tracto intestinal (1-6). La activación del CFTR y la posterior potenciación de la secreción transepitelial de cloruro conducen a la estimulación de la secreción de sodio y agua en el lumen del intestino. Por lo tanto, desempeñándose como reguladores paracrinicos de la actividad de CFTR, los agonistas del receptor de GMPc regulan el transporte de fluidos y de electrolitos en el tracto del GI (1-6; patente de Estados Unidos 5.489.670). Por lo tanto, la activación mediada por GMPc del CFTR y la señalización aguas abajo desempeñan un papel importante en el funcionamiento normal de la fisiología del intestino. Por lo tanto, cualquier anomalía en este proceso podría conducir de forma potencial a trastornos gastrointestinales tales como el síndrome del colon irritable, la enfermedad inflamatoria intestinal, la acidez excesiva y el cáncer (25, 26).

15

20

25

30

35

El proceso de renovación epitelial implica la proliferación, migración, diferenciación, senescencia y la pérdida eventual de células GI en el lumen (7, 8). La mucosa GI puede dividirse en tres zonas distintas a base del índice de proliferación de las células epiteliales. Una de estas zonas, la zona proliferativa, consiste en células madre indiferenciadas responsables de proporcionar una fuente constante de células nuevas. Las células madre migran hacia arriba, hacia el lumen, en la que se extruden. A medida que migran, las células pierden su capacidad de dividirse y diferenciarse, para llevar a cabo funciones especializadas de la mucosa GI (9). La renovación de la mucosa GI es muy rápida, produciéndose un recambio completo al cabo de un periodo de 24-48 horas (9). Durante este proceso las células mutadas y no deseadas se reponen con células nuevas. Por lo tanto, la homeostasis de la mucosa GI se regula mediante el mantenimiento continuo del balance de las velocidades de proliferación y de apoptosis (8).

40

45

Las velocidades de proliferación y apoptosis celular en el epitelio del intestino pueden aumentarse o disminuirse en una amplia diversidad de circunstancias distintas, por ejemplo, en respuesta a estímulos fisiológicos tales como el envejecimiento, señales inflamatorias, hormonas, péptidos, factores de crecimiento, productos químicos y hábitos alimentarios. Además, una velocidad de proliferación potenciada se asocia con frecuencia con una reducción del tiempo de recambio y una expansión de la zona proliferativa (10). Se ha observado que el índice de proliferación es mucho mayor en los casos patológicos de colitis ulcerosa y de otros trastornos GI (11). Por lo tanto, la hiperplasia intestinal es el principal promotor de la inflamación y la carcinogénesis gastrointestinales.

50

55

60

Además de un papel para la uroguanilina y la 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 manteniendo el balance entre la proliferación y la apoptosis en las células que recubren la mucosa GI. Por lo tanto, cualquier alteración de este proceso de renovación, debido a la producción reducida de uroguanilina y/o guanilina puede conducir a la inflamación GI y al cáncer (25, 26). Esto es consistente con los datos publicados anteriormente en el documento WO 01/25266, que sugieren que un péptido con el dominio activo de la uroguanilina puede funcionar como un inhibidor del desarrollo de pólipos en el colon y puede constituir un tratamiento del cáncer de colon. Sin embargo, datos recientes también sugieren que la uroguanilina también se une a un receptor actualmente desconocido, el cual es distinto del receptor de la GC-C (3,4). Los ratones genosuprimidos que carecen de este receptor guanilato ciclasa muestran resistencia a los péptidos ST en el intestino, pero no están afectados los efectos de la uroguanilina y de los péptidos ST en el riñón *in vivo* (3). Estos resultados estaban respaldados además por el hecho de que la despolarización de la membrana inducida por guanilina se bloqueaba por genisteína, un inhibidor de la tirosina quinasa, mientras que la hiperpolarización inducida por la uroguanilina no estaba afectada (12, 13). Por lo tanto, no está claro si las actividades anti cáncer de colon y anti inflamatorias de la uroguanilina y sus análogos están mediadas a través de la unión a uno o ambos de estos receptores.

65

La enfermedad inflamatoria intestinal es un nombre general dado a un grupo de trastornos que provocan que los intestinos se inflamen, caracterizados por un tejido rojo e inflamado. La inflamación gastrointestinal (GI) puede ser una afección crónica y a menudo conduce al cáncer GI (14). Los ejemplos de tales enfermedades inflamatorias

intestinales (EII) incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU). Se estima que están aquejados de EII hasta 1.000.000 de estadounidenses, con los pacientes masculinos y femeninos que parece estar igualmente afectados. La mayoría de los casos se diagnostica antes de los 30 años, pero la enfermedad puede aparecer en la sexta o séptima década, o más tarde.

5 La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria grave que afecta predominantemente al íleo y al colon, pero también puede producirse en otras secciones del tracto GI, mientras que la CU es exclusivamente una enfermedad inflamatoria del colon, el intestino grueso (15). A diferencia de la enfermedad de Crohn, en la cual están implicadas todas las capas del intestino, y en la cual puede haber un intestino sano normal entre los parches de  
10 intestino enfermo, la CU afecta solo el revestimiento más interno (mucosa) del colon, de una manera continua (16). Dependiendo de qué porción del tracto GI esté implicada, la enfermedad de Crohn puede denominarse como ileítis, enteritis regional, colitis, etc. La enfermedad de Crohn y la CU difieren del colon irritable o del síndrome del colon irritable, que son trastornos de la motilidad del tracto GI.

15 Aunque no se conoce la causa precisa de la EII, se cree que puede estar implicada en la enfermedad la alteración del proceso de renovación continua de la mucosa GI (17,18). El proceso de renovación del revestimiento GI es un proceso eficaz y dinámico que implica la proliferación continua y la reposición de las células dañadas no deseadas. Las velocidades de proliferación del revestimiento de células de la mucosa GI son muy altas, solo por detrás del sistema hematopoyético. Por lo tanto, el balance entre la proliferación y apoptosis es importante para el  
20 mantenimiento de la homeostasis de la mucosa GI (19,20).

El elevado índice proliferativo de las células epiteliales GI en pacientes de EII podría también estar vinculado a una incidencia más alta de cáncer de colon en pacientes de EII. Por lo tanto, los agonistas de la GC-C podrían también ser útiles para retardar el inicio de la EII en el desarrollo del cáncer de colon. La combinación de agonistas de la  
25 GC-C con inhibidores la PDE podría ser particularmente más útil en el tratamiento de la EII y del cáncer de colon.

La enterocolitis necrosante (ECN) es una afección inflamatoria devastadora del tracto gastrointestinal que aqueja al 10 % de los recién nacidos prematuros que pesan menos de 1500 gramos. A pesar de los avances médicos modernos, la etiología sigue siendo desconocida y la morbilidad y la mortalidad son inaceptablemente elevadas, sucumbiendo a la enfermedad tanto como el 10-30 % de los lactantes afectados. Aunque la patofisiología se entiende de forma incompleta, se sabe que la prematuridad, la alimentación con preparados para lactantes, la isquemia intestinal y la colonización bacteriana son factores de riesgo importantes. Se ha sugerido que estos factores de riesgo inician la activación de la respuesta proinflamatoria, que en última instancia conduce a la necrosis del intestino y en algunos casos al síndrome de disfunción multiorgánica y la muerte. Se han identificado múltiples mediadores inflamatorios que podrían contribuir a esta ruta común final. Se han estudiado con detalle en modelos animales, en seres humanos e *in vitro*, varias de las moléculas pro- y antiinflamatorias, incluyendo las IL -6, IL-8 e IL-10, así como el óxido nítrico, los radicales de oxígeno libres y muchos otros. Anteriormente, los inventores informaron que SP-304 mejora la inflamación GI en modelos experimentales de colitis murina, posiblemente a través de la regulación por disminución de las citocinas proinflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-17, IL-23 y TNF- $\alpha$ .  
30 (Shailubhai *et al.*, 2007 y 2008). Por lo tanto, los agonistas de la GC-C tales como la uroguanilina, la guanilina, los péptidos ST de la enterotoxina de *E. coli* y sus análogos podrían utilizarse para prevenir, controlar y tratar la ECN. Los agonistas de la GC-C pueden proporcionarse ya sea en el agua potable o en la leche materna para tratar la ECN en bebés recién nacidos.

45 La homeostasis GI depende tanto de la proliferación como de la muerte celular programada (apoptosis) de las células epiteliales que recubren la mucosa intestinal. Por lo tanto, a partir de las vellosidades del intestino se pierden células hacia el lumen de forma continua y se reponen a una velocidad sustancialmente equivalente por la proliferación de células en las criptas, seguido de su movimiento hacia las vellosidades. Se ha hecho cada vez más obvio que el control de la muerte celular es un regulador igualmente, si no más, importante, del número de células y del índice de proliferación celular (19,20). Las velocidades reducidas de apoptosis a menudo se asocian con el crecimiento anómalo, inflamación y transformación neoplásica. Por lo tanto, la proliferación disminuida y/o la muerte celular aumentada podrían aumentar el número de células, mientras que la proliferación aumentada y/o la muerte celular reducida podría aumentar el índice de proliferación del tejido intestinal (20), lo que puede conducir a enfermedades inflamatorias GI y al cáncer.

55 Los péptidos uroguanilina y guanilina también parecen promover la apoptosis controlando el flujo celular de iones. Las alteraciones en la apoptosis se han asociado con la evolución tumoral al fenotipo metastásico. Aunque un cáncer gastrointestinal (GI) primario está limitado al intestino delgado, el colon y el recto, puede metastatizar y propagarse a lugares tales como el hueso, los ganglios linfáticos, el hígado, el pulmón, el peritoneo, los ovarios y el cerebro. Potenciando la salida de K<sup>+</sup> y la entrada de Ca<sup>++</sup>, la uroguanilina y los péptidos relacionados pueden promover la muerte de células transformadas y, de este modo, inhibir la metástasis.  
60

El síndrome del colon irritable (SCI) y el estreñimiento idiopático crónico son afecciones patológicas que pueden provocar una gran incomodidad intestinal y malestar, pero a diferencia de las enfermedades EII, tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, el SCI no provoca la grave inflamación o los cambios en el tejido intestinal, y no se cree que aumente el riesgo de cáncer colorrectal. En el pasado, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la  
65

enfermedad celíaca y el síndrome del colon irritable (SCI) eran considerados trastornos totalmente distintos. Ahora, con la descripción de la inflamación en el SII, aunque leve, y de los síntomas que se solapan entre el SCI y la enfermedad celíaca, esta aseveración está en entredicho. La gastroenteritis bacteriana aguda es el factor de riesgo más fuerte identificado a la fecha para el posterior desarrollo del síndrome del colon irritable posinfeccioso. Los factores de riesgo clínicos incluyen enfermedad aguda prolongada y la ausencia de vómitos. Una susceptibilidad determinada de forma genética a estímulos inflamatorios también puede ser un factor de riesgo para el síndrome del colon irritable. La patofisiología subyacente indica una permeabilidad intestinal aumentada y una inflamación leve, así como la motilidad y la sensibilidad visceral alteradas (27). La serotonina (5-hidroxitriptamina [5-HT]) es un modulador clave en la función intestinal y se sabe que desempeña un papel importante en la patofisiología del SII. Se ha demostrado que la actividad de la 5-HT está regulada por GMPc (28). Por lo tanto, a base de esta observación, así como otros efectos del GMPc, los inventores creen que los agonistas de la GC-C serán útiles en el tratamiento del SII.

Dada la prevalencia de afecciones inflamatorias en las sociedades occidentales y del riesgo paralelo de desarrollo de lesiones cancerosas a partir de tejido inflamado, en particular del tejido intestinal, existe una necesidad de mejorar las opciones de tratamiento para las afecciones inflamatorias, en particular del tracto gastrointestinal.

Schulz *et al.* (Journal of Peptide Science, vol. 11, n.º 6, junio de 2005, p 319-330) describe un conjunto de péptidos L-alanina-sustituídos y péptidos quiméricos de guanilina, uroguanilina y ST de *E. coli*.

Estos se analizaron para determinar los restos de aminoácido que afectan la interconversión de los péptidos de guanilina y uroguanilina.

Gali *et al.* (Nuclear Medicine & Biology, vol 28, n.º 8, 1 noviembre de 2001, p 903-909) describen una evaluación *in vivo* de un análogo DOTA-NCS-ST, para determinar la captación tumoral *in vivo* y la farmacocinética de este análogo en ratones con inmunodeficiencia combinada grave que tienen tumor LS-180.

Vaandrager (Molecular & Cellular Biochemistry, vol 230, n.º 1-2, enero de 2002, p 73-83) describe la estructura y función del receptor de la enterotoxina termoestable/guanilato ciclasa C.

Beltowski (Journal of Physiology & Pharmacology, vol 52, n.º 3, 1 septiembre de 2001, p 351-375) es un artículo de revisión que describe a la guanilina y péptidos relacionados.

Shailubhai (Current Opinion in Drug Discovery & Development, vol 5, n.º 2, marzo de 2002, p 261-268) describe diversas aplicaciones terapéuticas de los agonistas de la guanilato ciclasa C.

El documento WO 02/078683 describe agonistas del receptor guanilato ciclasa para el tratamiento de la inflamación de tejidos y de la carcinogénesis.

#### 40 **Sumario de la invención**

La presente invención es a base del desarrollo de agonistas del receptor guanilato ciclasa. Los agonistas son análogos de la uroguanilina, guanilina, linfoguanilina y péptidos ST, y tienen propiedades preeminentes tales como, por ejemplo, una alta resistencia a la degradación en el extremo N y el extremo C por carboxipeptidasas y/o por otras enzimas proteolíticas presentes en los jugos intestinales humanos y los jugos gástricos humanos simulados.

Los péptidos de la invención pueden utilizarse para tratar cualquier afección que responda a los niveles intracelulares potenciados de GMPc. Los niveles intracelulares de GMPc pueden aumentarse potenciando la producción intracelular de GMPc y/o mediante la inhibición de su degradación por fosfodiesterasas GMPc específicas. Entre las afecciones específicas que pueden tratarse o prevenirse están los trastornos gastrointestinales, los trastornos inflamatorios, los trastornos pulmonares, el cáncer, los trastornos cardíacos, los trastornos oculares, los trastornos bucales, los trastornos sanguíneos, los trastornos hepáticos, los trastornos cutáneos, los trastornos de la próstata, los trastornos endocrinos, el aumento de la motilidad gastrointestinal y la obesidad. Los trastornos gastrointestinales incluyen, por ejemplo, el síndrome del colon irritable (SCI), la dispepsia no ulcerosa, la pseudo obstrucción intestinal crónica, la dispepsia funcional, la pseudo obstrucción del colon, el reflujo duodenogástrico, la enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), la inflamación del íleo (por ejemplo, el íleo posoperatorio), la gastroparesis, la acidez gástrica (la acidez elevada en el tracto GI), el estreñimiento (por ejemplo, el estreñimiento asociado al uso de medicamentos tales como los opioides, los fármacos para la osteoartritis, los fármacos para la osteoporosis; el estreñimiento posquirúrgico, el estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos. Los trastornos inflamatorios incluyen la inflamación de tejidos y órganos tales como la inflamación del riñón, (por ejemplo, nefritis), inflamación del aparato gastrointestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), enterocolitis necrosante (ECN); inflamación pancreática (por ejemplo, pancreatitis), inflamación pulmonar (por ejemplo, bronquitis o asma) o inflamación cutánea (por ejemplo, psoriasis, eccema). Los trastornos del pulmón incluyen, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis. El cáncer incluye la carcinogénesis de tejidos y órganos incluyendo metástasis tales como, por ejemplo, el cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer intestinal, cáncer anal,

cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar o cáncer de colon; cáncer de pulmón; cáncer de tiroides; cáncer de la piel (por ejemplo, melanoma); cáncer bucal; cáncer del tracto urinario (por ejemplo, cáncer de vejiga o cáncer de riñón); cáncer de células sanguíneas (por ejemplo, mieloma o leucemia) o cáncer de próstata. Los trastornos cardíacos incluyen, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión de cardias de la tráquea, colesterol alto o triglicéridos altos. Los trastornos hepáticos incluyen, por ejemplo, cirrosis y fibrosis. Además, el agonista de la GC-C también puede ser útil para facilitar la regeneración del hígado en los pacientes con trasplante de hígado. Los trastornos oculares incluyen, por ejemplo, tensión intraocular aumentada, glaucoma, degeneración retiniana, ojos secos, trastornos de las glándulas lagrimales o inflamación ocular. Los trastornos cutáneos incluyen, por ejemplo, xerosis. Los trastornos bucales incluyen, por ejemplo, boca seca (xerostomía), síndrome de Sjögren, enfermedades de la encías (por ejemplo, periodontitis) o bloqueo o malfuncionamiento del conducto de la glándula salival. Los trastornos de la próstata incluyen, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna (HPB). Los trastornos endocrinos incluyen, por ejemplo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, hipotiroidismo y fibrosis quística.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y a las composiciones terapéuticas que contienen estos péptidos.

Los péptidos pueden estar en una composición farmacéutica en una forma farmacéutica unitaria, junto con uno o más transportadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a una entidad de suministro de fármacos individual, por ejemplo, un comprimido, cápsula, solución o formulación de inhalación. La cantidad de péptido presente debería ser suficiente para tener un efecto terapéutico positivo cuando se administra a un paciente (normalmente, entre 100 µg y 3 g). Lo que constituye un "efecto terapéutico positivo" dependerá de la afección particular a tratar 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, la contracción de pólipos o tumores, una reducción de lesiones metastásicas, etc.

En aún otro aspecto, una invención proporciona la administración a dicho paciente de una dosis eficaz de un inhibidor de la fosfodiesterasa GMPc específica (GMPc-PDE) ya sea de forma simultánea o secuencial con dicho agonista del receptor guanilato ciclasa. El inhibidor de la GMPc-PDE incluye, por ejemplo, sulindaco sulfona, zaprinast y motapizona, vardenafil y sildenafil. Además, los péptidos agonistas de la GC-C pueden utilizarse en combinación con los inhibidores de los transportadores de nucleótidos cíclicos.

De forma opcional, también se administran agentes antiinflamatorios. Los agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINE).

Otras características y ventajas de la invención serán obvias a partir de, y están abarcadas por, la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

#### **Descripción detallada**

La presente invención es a base del desarrollo de agonistas de la guanilato ciclasa C (GC-C). Los agonistas son análogos de uroguanilina, guanilina, linfoguanilina y péptido ST, y tienen propiedades preminentes tales como, por ejemplo, alta resistencia a la degradación en el extremo N y extremo C por carboxipeptidasas y/o por otras enzimas proteolíticas tales como las presentes en el fluido intestinal simulado (FIS) humano y el fluido gástrico simulado (FGS) humano.

La GC-C se expresa en diversas células, incluyendo las células epiteliales gastrointestinales y los tejidos extraintestinales incluyendo riñón, pulmón, páncreas, hipófisis, suprarrenal, hígado en desarrollo, corazón y los tejidos reproductores masculinos y femeninos (revisado en Vaandrager 2002 Mol Cell Biochem 230:73-83). La GC-C es un regulador clave del balance de fluidos y de electrolitos en el intestino y el riñón. En el intestino, cuando está estimulado, la GC-C provoca un aumento en el GMPc epitelial intestinal. Este aumento en el GMPc provoca una disminución de la absorción de agua y de sodio, y un aumento de la secreción de iones cloruro y potasio, lo que conduce a cambios en el fluido intestinal y en el transporte electrolitos, y una motilidad intestinal aumentada.

Los agonistas de la guanilato ciclasa C de acuerdo con la invención incluyen la secuencia de aminoácidos compendiada a continuación en la Tabla I. Los agonistas de la guanilato ciclasa C de acuerdo con la invención se denominan en el presente documento "péptidos GCRA".



de la motilidad gastrointestinal y la obesidad. Los trastornos gastrointestinales incluyen, por ejemplo, el síndrome del colon irritable (SCI), la dispepsia no ulcerosa, la pseudo obstrucción intestinal crónica, la dispepsia funcional, la pseudo obstrucción del colon, el reflujo duodenogástrico, la enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), íleo (por ejemplo, el íleo posoperatorio), gastroparesis, acidez gástrica (alta acidez en el tracto GI), estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado con el uso de medicamentos tales como opioides, fármacos para la osteoartritis, fármacos para la osteoporosis; estreñimiento posquirúrgico, estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos. Los trastornos inflamatorios incluyen inflamación de tejidos y órganos tales como inflamación del riñón (por ejemplo, nefritis), inflamación del aparato gastrointestinal por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enterocolitis necrosante; inflamación pancreática (por ejemplo, pancreatitis), inflamación del pulmón (por ejemplo, bronquitis o asma) o inflamación cutánea (por ejemplo, psoriasis, eccema). Los trastornos pulmonares incluyen, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis. El cáncer incluye carcinogénesis de tejidos y órganos, incluyendo metástasis tales como, por ejemplo, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer intestinal, cáncer anal, cáncer hepático, cáncer de la vesícula biliar o cáncer de colon; cáncer de pulmón; cáncer de tiroides; cáncer de piel (por ejemplo, melanoma); cáncer bucal; cáncer del tracto urinario (por ejemplo, cáncer de vejiga o cáncer de riñón); cáncer de células sanguíneas (por ejemplo, mieloma o leucemia) o cáncer de próstata. Los trastornos cardíacos incluyen, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión de cardias de la tráquea, colesterol alto o triglicéridos altos. Los trastornos hepáticos incluyen, por ejemplo, cirrosis y fibrosis. Los trastornos oculares incluyen, por ejemplo, tensión intraocular aumentada, glaucoma, ojos secos, degeneración retiniana, trastornos de la glándula lagrimal o inflamación ocular. Los trastornos cutáneos incluyen, por ejemplo, xerosis. Los trastornos bucales incluyen, por ejemplo, boca seca (xerostomía), enfermedad de Sjögren, enfermedades de la encía (por ejemplo, periodontitis) o bloqueo o mal funcionamiento del conducto de la glándula salival. Los trastornos de la próstata incluyen, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna (HPB). Los trastornos endocrinos incluyen, por ejemplo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, hipotiroidismo y fibrosis quística.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "guanilato ciclasa C (GC-C)" se refiere a la clase de receptor guanilato ciclasa C en cualquier tipo celular al cual los péptidos agonistas de la invención o los agonistas naturales descritos en el presente documento se unen. Como se utiliza en el presente documento, el "receptor guanilato ciclasa intestinal" se encuentra de forma exclusiva en las células epiteliales que recubren la mucosa GI. Se espera que la uroguanilina, la guanilina y los péptidos ST se unan a estos receptores y puedan inducir la apoptosis. La posibilidad de que pueda haber distintos receptores para cada péptido agonista no se excluye. Por lo tanto, el término se refiere a la clase de receptores guanilato ciclasa en las células epiteliales que recubren la mucosa GI.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "agonista de GCR" se entiende que se refiere a los péptidos y/u otros compuestos que se unen a una guanilato ciclasa C intestinal y estimulan el transporte de fluidos y de electrolitos. Esta expresión también incluye fragmentos y propéptidos que se unen a la GC-C y estimulan la secreción de fluidos y de agua.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sustancialmente equivalente" se entiende que se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos equivalente a la del dominio de unión, en donde determinados restos pueden estar delecionados o reemplazados por otros aminoácidos sin afectar la capacidad del péptido de unirse a un receptor guanilato ciclasa intestinal y estimular el transporte de fluidos y electrolitos.

La adición de transportadores (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato o PBS) y de otros componentes a la composición de la presente invención, está dentro del nivel de la experiencia en la técnica. Además del compuesto, tales composiciones pueden contener transportadores farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes conocidos para facilitar la administración y/o potenciar la captación. También pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención otras formulaciones, tales como microesferas, nanopartículas, liposomas y sistemas basados de forma inmunológica. Otros ejemplos incluyen formulaciones con polímeros (por ejemplo, polietilenglicol al 20 % p/v) o celulosa, o formulaciones entéricas.

La presente invención es a base de varios conceptos. El primero es que hay un mecanismo dependiente de GMPc que regula el balance entre proliferación y apoptosis celulares, y que una reducción de los niveles de GMPc, debido a una deficiencia de uroguanilina/guanilina, y/o debido a la activación de fosfodiesterasas GMPc específicas, es una etapa temprana y crítica en la transformación neoplásica. Un segundo concepto es que la liberación de ácido araquidónico a partir de la membrana de fosfolípidos, lo que conduce a la activación de la fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2), la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y posiblemente la 5-lipooxigenasa (5-LO) durante el proceso de inflamación, está regulada de forma negativa mediante un mecanismo dependiente de GMPc, lo que conduce a niveles reducidos de prostaglandinas y leucotrienos, y que el aumento de los niveles intracelulares de GMPc puede por lo tanto producir una respuesta antiinflamatoria. Además, se cree que en el control de los procesos proinflamatorios está implicado un mecanismo dependiente de GMPc. Por lo tanto, la elevación de los niveles intracelulares de GMPc puede utilizarse como un medio para tratar y controlar los trastornos gastrointestinales, los trastornos inflamatorios, los trastornos pulmonares, el cáncer, los trastornos cardíacos, los trastornos oculares, los trastornos bucales, los trastornos sanguíneos, los trastornos hepáticos, los trastornos cutáneos, los trastornos de la próstata, los trastornos endocrinos, el aumento de la motilidad gastrointestinal y la obesidad. Los trastornos gastrointestinales incluyen, por ejemplo, el síndrome del colon irritable (SCI), dispepsia no ulcerosa, pseudo

obstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudo obstrucción del colon, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), íleo (por ejemplo, íleo posoperatorio), gastroparesis, acidez gástrica (alta acidez en el tracto GI), estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado con el uso de medicamentos tales como opioides, fármacos para la osteoartritis, fármacos para la osteoporosis; estreñimiento posquirúrgico, estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos. Los trastornos inflamatorios incluyen inflamación de tejidos y órganos tales como inflamación del riñón (por ejemplo, nefritis), inflamación del aparato gastrointestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enterocolitis necrosante; inflamación pancreática (por ejemplo, pancreatitis), inflamación pulmonar (por ejemplo, bronquitis o asma) o inflamación cutánea (por ejemplo, psoriasis, eccema). Los trastornos pulmonares incluyen, por ejemplo, EPOC y fibrosis. El cáncer incluye carcinogénesis de tejidos y órganos incluyendo metástasis tales como, por ejemplo, cáncer gastrointestinal, (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer intestinal, cáncer anal, cáncer hepático, cáncer de la vesícula biliar o cáncer de colon; cáncer de pulmón; cáncer de tiroides; cáncer de la piel (por ejemplo, melanoma); cáncer bucal; cáncer del tracto urinario (por ejemplo, cáncer de vejiga o cáncer de riñón); cáncer de células sanguíneas (por ejemplo, mieloma o leucemia) o cáncer de próstata. Los trastornos cardíacos incluyen, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión de cardias de la tráquea, colesterol alto o triglicéridos altos. Los trastornos hepáticos incluyen, por ejemplo, cirrosis y fibrosis. Los trastornos oculares incluyen, por ejemplo, tensión intraocular aumentada, glaucoma, ojos secos, degeneración retiniana, trastornos de las glándulas lagrimales o inflamación ocular. Los trastornos cutáneos incluyen, por ejemplo, xerosis. Los trastornos bucales incluyen, por ejemplo, boca seca (xerostomía), síndrome de Sjögren, enfermedades de la encía (por ejemplo, periodontitis) o bloqueo o mal funcionamiento del conducto de la glándula salival. Los trastornos de la próstata incluyen, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna (HPB). Los trastornos endocrinos incluyen, por ejemplo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, hipotiroidismo y fibrosis quística.

Sin intención de limitarse a teoría alguna, se prevé que el transporte de iones a través de la membrana plasmática pueda resultar un regulador importante del balance entre la proliferación y la apoptosis celulares, que estará afectado por agentes que modifican las concentraciones de GMPc. Se ha demostrado que la uroguanilina estimula la salida de K<sup>+</sup>, la entrada de Ca<sup>++</sup> y el transporte de agua en el tracto gastrointestinal (3). Además, también se ha demostrado que el péptido atrial natriurético (PAN), un péptido que también se une a un receptor guanilato ciclasa específico, induce apoptosis en células mesangiales de rata, y que induce apoptosis en miocitos cardíacos mediante un mecanismo de GMPc (21-24).

La unión de los presentes agonistas a un receptor guanilato ciclasa estimula la producción de GMPc. Esta interacción ligando-receptor induce apoptosis en las células diana a través de la activación de una cascada de proteína quinasas dependientes de GMPc y del CFTR. Por lo tanto, la administración de los péptidos nuevos y los enumerados en la Tabla I es útil en la eliminación o, al menos el retraso, del inicio de los trastornos gastrointestinales, los trastornos inflamatorios, los trastornos pulmonares, el cáncer, los trastornos cardíacos, los trastornos oculares, los trastornos bucales, los trastornos sanguíneos, los trastornos hepáticos, los trastornos cutáneos, los trastornos endocrinos, el aumento de la motilidad gastrointestinal y la obesidad. Los trastornos gastrointestinales incluyen, por ejemplo, síndrome del colon irritable (SCI), dispepsia no ulcerosa, pseudo obstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudo obstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), inflamación del íleo (por ejemplo, íleo posoperatorio), gastroparesis, acidez gástrica (alta acidez en el tracto GI), estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado con el uso de medicamentos tales como opioides, fármacos para la osteoartritis, fármacos para la osteoporosis; estreñimiento posquirúrgico, estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos. Los trastornos inflamatorios incluyen inflamación de tejidos y órganos tales como inflamación del riñón (por ejemplo, nefritis), inflamación del aparato gastrointestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enterocolitis necrosante; inflamación pancreática (por ejemplo, pancreatitis), inflamación pulmonar (por ejemplo, bronquitis o asma) o inflamación cutánea (por ejemplo, psoriasis, eccema). Los trastornos pulmonares incluyen, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis. El cáncer incluye carcinogénesis de tejidos y órganos, incluyendo metástasis tales como, por ejemplo, cáncer gastrointestinal, (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer intestinal, cáncer anal, cáncer hepático, cáncer de la vesícula biliar o cáncer de colon; cáncer de pulmón; cáncer de tiroides; cáncer de piel (por ejemplo, melanoma); cáncer bucal; cáncer del tracto urinario (por ejemplo, cáncer de vejiga o cáncer de riñón); cáncer de células sanguíneas (por ejemplo, mieloma o leucemia) o cáncer de próstata. Los trastornos cardíacos incluyen, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión de cardias de la tráquea, colesterol alto o triglicéridos altos. Los trastornos hepáticos incluyen, por ejemplo, cirrosis y fibrosis. Los trastornos oculares incluyen, por ejemplo, tensión intraocular aumentada, glaucoma, ojos secos, degeneración retiniana, trastornos de las glándulas lagrimales o inflamación ocular. Los trastornos cutáneos incluyen, por ejemplo, xerosis. Los trastornos bucales incluyen, por ejemplo, boca seca (xerostomía), síndrome de Sjögren, enfermedades de la encía (por ejemplo, periodontitis) o bloqueo o mal funcionamiento del conducto de la glándula salival. Los trastornos de la próstata incluyen, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna (HPB). Los trastornos endocrinos incluyen, por ejemplo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, hipotiroidismo y fibrosis quística.

La uroguanilina es una hormona peptídica circulante con actividad natriurética que se ha descubierto que estimula el transporte de fluidos y electrolitos, de una manera similar a otra familia de enterotoxinas termoestables (péptido ST) secretadas por cepas patógenas de *E. coli* y otras bacterias entéricas que activan el receptor guanilato ciclasa y provocan diarrea secretora. A diferencia de los péptidos ST bacterianos, la unión de la uroguanilina al receptor

guanilato ciclasa es dependiente 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 provocar diarrea grave.

## PEPTIDOS GCRA

5 En un aspecto, la invención proporciona un péptido GCRA. Los péptidos GCRA son análogos de la uroguanilina, guanilina, linfoguanilina y péptidos ST. En el término "péptido" no está implicada una longitud particular. En algunas realizaciones, el péptido GCRA es de menos de 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, menos de o igual a 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, o 5 aminoácidos de longitud.

10 Los péptidos GCRA pueden ser polímeros de L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de ambos. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los péptidos son péptidos retro-inversos D. La expresión "isómero retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el cual la dirección de la secuencia está invertida y la quiralidad de cada resto 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 la posición de los grupos de la cadena lateral en cada carbono alfa se conserva. A menos que se establezca de forma específica otra cosa, se presumen que cualquier secuencia de L-aminoácidos dada de la invención puede fabricarse en un péptido retro-inverso D sintetizando una inversión de la secuencia para la correspondiente secuencia natural de L-aminoácidos. Por ejemplo, un péptido GCRA puede incluir la secuencia enumerada en la Tabla I.

25 Por inducción de la producción de GMPc se entiende que el péptido GCRA induce la producción de GMPc intracelular. El GMPc intracelular se mide mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el péptido GCRA de la invención estimula el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 90 % o más de GMPc intracelular, en comparación con los agonistas de la GC-C de origen natural. Naturalmente, de forma opcional, los péptidos GCRA de la invención estimulan el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 90 % o más de GMPc intracelular, en comparación con SP-304. En realizaciones adicionales, el péptido GCRA estimula la apoptosis, por ejemplo la muerte celular programada, o activa el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). En algunas realizaciones, los péptidos GCRA descritos en el presente documento son más estables que los agonistas de la GC-C de origen natural y/o que SP-304. Por más estable se entiende que el péptido se degrada menos y/o más lentamente en fluido gástrico simulado y/o en fluido intestinal simulado, en comparación con los agonistas de la GC-C de origen natural y/o con SP-304. Por ejemplo, el péptido GCRA de la invención se degrada el 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 90 % o menos, en comparación con los agonistas de la GC-C de origen natural y/o con SP-304.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "AMIDA" se entiende que denota que el ácido carboxílico terminal está reemplazado por un grupo amida, es decir, el COOH terminal está reemplazado por CONH<sub>2</sub>.

40 Como se utiliza en el presente documento (por ejemplo, en las Fórmulas I-III), X<sub>aa</sub> es cualquier aminoácido o análogo de aminoácido natural o no natural; M<sub>aa</sub> es una Cisteína (Cys), Penicilamina (Pen), homocisteína o 3-mercaptoprolina. X<sub>aa<sub>n</sub>1</sub> se entiende que denota una secuencia de aminoácidos de cualquier aminoácido o análogo de aminoácido natural o no natural que tiene uno o dos restos de longitud. De forma adicional, cualquier aminoácido representado por X<sub>aa</sub> puede ser un L-aminoácido, un D-aminoácido, un aminoácido metilado, un aminoácido fluorado o cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, el aminoácido en el extremo N, extremo C o ambos, son D-aminoácidos. De forma opcional, cualquier péptido GCRA representado por las Fórmulas I-III puede contener uno o más restos polietilenglicol en el extremo N, extremo C o ambos. Un polietilenglicol ejemplar incluye ácido aminoetiloxi-etiloxi-acético y polímeros del mismo.

50 En determinadas realizaciones, uno o más aminoácidos de los péptidos GCRA pueden reemplazarse por un aminoácido que no es de origen natural o un aminoácido análogo de origen natural o no natural. Hay muchos aminoácidos más allá de los 20 convencionales (Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val). Algunos son de origen natural y otros no. (Véase, por ejemplo, Hunt, The Non-Protein Amino Acids: In Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, Barrett, Chapman and Hall, 1985). Por ejemplo, un aminoácido aromático puede reemplazarse por 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, 3-yodo-L-tirosina, triyodotironina, L-tiroxina, fenilglicina (Phg) o nortirosina (norTyr). Phg y norTyr, y otros aminoácidos incluyendo Phe y Tyr, pueden sustituirse por, por ejemplo, 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. Cualquier aminoácido puede sustituirse por la forma D del aminoácido.

60 Con respecto a los aminoácidos de origen no natural o los análogos de aminoácido de origen natural o no natural, son posibles varias sustituciones en el polipéptido y los agonistas descritos en el presente documento, solas o en combinación.

65 Por ejemplo, los restos glutamina pueden sustituirse por gamma-hidroxi-Glu o gamma-carboxi-Glu. Los restos tirosina pueden sustituirse por un aminoácido alfa sustituido tal 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-quinolin-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. Los restos prolina pueden sustituirse por homopro (ácido L-pipecólico); hidroxil-Pro; 3,4-deshidro-Pro; 4-fluoro-Pro o alfa-metil-Pro, o análogos de aminoácidos ciclizados N(alfa)-C(alfa) con la estructura: n = 0, 1, 2, 3. Los restos alanina pueden sustituirse por aminoácidos alfa sustituidos o N-metilados tales como ácido alfa-amino isobutírico (aib), L/D-alfa-etilalanina (L/D-isovalina), L/D-metilvalina o L/D-alfa-metileucina, o un aminoácido no natural tal como beta-fluoro-Ala. La alanina también puede sustituirse con: n = 0, 1, 2, 3. Los restos glicina pueden sustituirse por ácido alfa-amino isobutírico (aib) o L/D-alfa-etilalanina (L/D-isovalina).

Los ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales 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 alquilo, arilo, acilo, azido, ciano, halo, hidrazina, hidrazida, hidroxilo, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, sulfonilo, seleno, éster, tioácido, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfino, heterocíclico, enona, imina, aldehído, hidroxilamina, ceto o amino sustituido, o cualquier combinación de los mismos; un aminoácido con un entrecruzador fotoactivable; un aminoácido marcado con espín; un aminoácido fluorescente; un aminoácido con un grupo funcional nuevo; un aminoácido que interactúa de forma covalente o no covalente con otra molécula; un aminoácido de unión a metales; un aminoácido que está amidado en un sitio que no está imidado de forma natural, un aminoácido que contiene metal; un aminoácido radioactivo; un aminoácido foto-enjaulado y/o fotoisomerizable; un aminoácido que contiene biotina o un análogo de biotina; un aminoácido glucosilado o modificado por carbohidrato; un aminoácido que contiene un ceto; aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter; un aminoácido sustituido con átomos pesados (por ejemplo, un aminoácido que contiene deuterio, tritio,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  o  $^{18}\text{O}$ ); un aminoácido escindible de forma química o fotoescindible; un aminoácido con una cadena lateral elongada; un aminoácido que contiene un grupo tóxico; un aminoácido sustituido con azúcares, por ejemplo, una serina sustituida con azúcares o similar; un aminoácido que contiene azúcares enlazadas por carbono; un aminoácido redox-activo; un aminoácido que contiene  $\alpha$ -hidroxil; un aminoácido que contiene amino tio ácido; un aminoácido  $\alpha$ ,  $\alpha$  disustituido; un  $\beta$ -aminoácido; un aminoácido cíclico que no sea prolina; una O-metil-L-tirosina; una L-3-(2-naftil)alanina; una 3-metil-fenilalanina; 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 fosfonotirosina; una p-iodo-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, isopropilo u O-alilo; una dopa, O-metil-L-tirosina; un aminoácido glucosilado; una p-(propargiloxi)fenilalanina; dimetil-lisina; hidroxil-prolina; ácido mercaptopropiónico; metil-lisina; 3-nitro-tirosina; norleucina; ácido piroglutámico; Z (carbобензоил);  $\epsilon$ -acetil-lisina;  $\beta$ -alanina; derivado de aminobenzoílo; 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 por acetamidometilo y aminoácidos pegilados. Los ejemplos adicionales de aminoácidos y análogos de aminoácido no naturales pueden encontrarse en los documentos US 20030108885, US 20030082575, US20060019347 (párrafos 410-418) y las referencias citadas en ellos. Los polipéptidos de la invención pueden incluir modificaciones adicionales que incluyen las descritas en el documento US20060019347, párrafo 589.

En algunas realizaciones, se puede reemplazar un aminoácido por un aminoácido de origen natural, no esencial, por ejemplo, taurina.

Como alternativa, los péptidos GCRA son péptidos cíclicos. Los péptidos GCRA cíclicos se preparan mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la macrociclización a menudo se lleva a cabo formando un enlace amida entre los extremos N y C del péptido, entre una cadena lateral y el extremo N o C [por ejemplo, con  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  a pH 8,5] (Samson *et al.*, *Endocrinology*, 137: 5182-5185 (1996)), o entre dos cadenas laterales de aminoácido, tal como cisteína. Véase, por ejemplo, DeGrado, *Adv Protein Chem*, 39: 51-124 (1988). En diversos aspectos, los péptidos GCRA son biciclos [4,12; 7,15].

En algunos péptidos GCRA, uno o ambos miembros de una o ambas parejas de restos Cys que habitualmente forman un enlace disulfuro pueden estar reemplazados por 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.

Además, pueden reemplazarse uno o más enlaces disulfuros mediante entrecruzamientos covalentes alternativos, por ejemplo, una unión amida (-CH<sub>2</sub>CH(O)NHCH 2- o -CH<sub>2</sub>NHCH(O)CH 2-), una unión éster, una unión tioéster, un puente lactamo, una unión carbamoilo, una unión de urea, una unión de tiourea, una unión de fosfonato éster, una unión alquilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), una unión alquenilo (-CH 2CH=CHCH 2-), una unión 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>-), una unión 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>-), una unión amina (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>NHCH 2CH<sub>2</sub>-) o una unión tioamida (-CH<sub>2</sub>CH(S)HNHCH 2- o -CH<sub>2</sub>NHCH(S)CH 2-). Por ejemplo, Ledu *et al.* (Proc Natl Acad. Sci. 100:11263-78, 2003) describe métodos para la preparación de entrecruzamientos lactamo y amida. Los péptidos GCRA ejemplares que incluyen un puente lactamo incluyen, por ejemplo, a SP-370.

Los péptidos GCRA pueden tener uno o más enlaces polipeptídicos convencionales reemplazados por un enlace alternativo. Tales reemplazos pueden aumentar la estabilidad del polipéptido. Por ejemplo, el reemplazo del enlace peptídico entre un resto amino terminal y un resto aromático (por ejemplo Tyr, Phe, Trp) con un enlace alternativo, puede reducir la escisión por carboxipeptidasas y puede aumentar la semivida en el tracto digestivo. Los enlaces que pueden reemplazar enlaces polipeptídicos incluyen: un enlace retro-inverso (C(O)-NH en lugar de NH-C(O)); un enlace amida reducido (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 fluoro sustituido (CF=CH); un enlace cetometileno (C(O)-CHR o CHR-C(O) en donde R es H o CH<sub>3</sub>); y un enlace fluoro-cetometileno (C(O)-CFR o CFR-C(O), en donde R es H o F o CH<sub>3</sub>).

Los péptidos GCRA pueden modificarse utilizando modificaciones convencionales. Las modificaciones pueden producirse en el extremo amino (N-), carboxilo (C-), de forma interna o una combinación de cualquiera de los anteriores. En un aspecto descrito en el presente documento, puede haber más de un tipo de modificación en el polipéptido. Las modificaciones incluyen, pero sin limitación: acetilación, biotilación, cinamoilación, farnesilación, formilación, miristoilación, palmitoilación, fosforilación (Ser, Tyr o Thr), estearoilación, succinilación, sulfurilación y ciclización (a través de puentes disulfuro o ciclación amida), y modificación por Cys3 o Cys5. Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden también modificarse por 2, 4-dinitrofenilo (DNP), DNP-lisina, modificación por 7-amino-4-metil-cumarina (AMC), flouresceína, NBD (7-nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol), p-nitro-anilida, rhodamina B, EDANS (5-((ácido 2-aminoetil)amino)naftalen-1-sulfónico), dabcilo, dabsilo, dansilo, rojo texas, FMOC y Tamra (tetrametilrhodamina). Los péptidos GCRA descritos en el presente documento también pueden conjugarse a, por ejemplo, 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, la patente de Estados Unidos 6.309.633; Soltero *et al.*, 2001 Innovations in Pharmaceutical Technology 106-110); BSA y HLC (hemocianina de lapa californiana). La adición de PEG y otros polímeros que pueden utilizarse para modificar polipéptidos de la invención se describe en el documento US20060 19347 sección IX.

Los péptidos GCRA también pueden incluir derivados de péptidos GCRA, que no se pretende que incluyan formas híbridas y modificadas de los péptidos GCRA en los que determinados aminoácidos se han deletado o reemplazado, y las modificaciones tales como en donde uno o más aminoácidos se han cambiado a un aminoácido modificado o aminoácido no usual, y las modificaciones tales como la glucosilación, en tanto la forma modificada conserve la actividad biológica de los péptidos GCRA. Por conservar la actividad biológica, se entiende que el GMPc y/o la apoptosis se inducen mediante el péptido GCRA, aunque no necesariamente al mismo nivel de potencia que un péptido GCRA de origen natural identificado.

Las variantes preferentes son las que tienen sustituciones de aminoácidos conservativas hechas en uno o más restos de aminoácido no esenciales predichos. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han identificado en la técnica las familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (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). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido GCRA se reemplaza por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Como alternativa, en otra realización, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante de GCRA, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden explorarse para identificar mutantes que conserven actividad.

También está incluido dentro del significado de sustancialmente homólogo cualquier péptido GCRA que pueda aislarse en virtud de la reactividad cruzada con anticuerpos para el péptido GCRA.

### PREPARACIÓN DE PÉPTIDOS GCRA

Los péptidos GCRA se preparan fácilmente utilizando técnicas de clonación modernas o pueden sintetizarse mediante métodos en estado sólido o mediante mutagénesis dirigida. Un péptido GCRA puede incluir formas negativas dominantes de un polipéptido.

En general, la síntesis química puede realizarse utilizando síntesis peptídica en fase en solución o en fase sólida convencional, en las que se produce una unión peptídica 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, como se formula anteriormente, requiere la supresión del carácter reactivo del grupo amino del primer y el grupo carboxilo del segundo aminoácido. Los sustituyentes enmascarantes deben permitir su eliminación fácil, sin inducir la descomposición de la lábil molécula peptídica.

- En la síntesis en fase en solución, puede utilizarse una amplia diversidad de métodos de acoplamiento y de grupos protectores (véase, Gross y Meienhofer, eds., "The Peptides: Analysis, Syntesis, Biology," Vol. 1-4 (Academic Press, 1979); Bodansky y Bodansky, "The Practice of Peptide Shyntesis," 2d ed. (Springer Verlag, 1994)). Además, son posibles la purificación intermedia y el cambio de escala lineal. Los expertos en la materia apreciarán que la síntesis en solución requiere la consideración de los grupos protectores de la cadena principal y de la cadena lateral y el método de activación. Además, es necesaria una cuidadosa selección de segmentos para minimizar la racemización durante la condensación de segmentos. Las condiciones de solubilidad también son un factor. La síntesis peptídica en fase sólida utiliza un polímero insoluble para el soporte durante la síntesis orgánica. La cadena peptídica soportada por el polímero permite el uso de etapas de lavado y filtración simples en lugar de purificaciones laboriosas en las etapas intermedias. La síntesis peptídica en fase sólida en general puede realizarse de acuerdo con el método de Merrifield *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85: 2149, que implica el ensamblaje de una cadena peptídica lineal sobre un soporte de resina, utilizando aminoácidos protegidos. La síntesis peptídica en fase sólida normalmente utiliza la estrategia Boc o Fmoc, las cuales son bien conocidas en la técnica.
- Los expertos en la materia reconocerán que en la síntesis en fase sólida, las reacciones de desprotección y de acoplamiento deben proceder hasta la finalización y los grupos bloqueantes de cadenas laterales deben ser estables a lo largo de toda la síntesis. Además, la síntesis en fase sólida en general es más adecuada cuando los péptidos han de fabricarse a pequeña escala.
- La acetilación del N terminal puede realizarse haciendo reaccionar el péptido final con anhídrido acético antes de la escisión de la resina. La C-amidación se lleva a cabo utilizando una resina apropiada tal como la resina de metilbencidrilamina utilizando la tecnología Boc.
- Como alternativa, los péptidos GCRA se producen mediante técnicas de clonación modernas. Por ejemplo, los péptidos GCRA se producen ya sea en bacterias que incluyen, pero sin limitación, *E. coli*, o en otro sistema existente para la producción de polipéptidos o proteínas (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, sistemas de expresión en baculovirus utilizando células Sf9 de Drosófila, sistemas de expresión en levadura o en hongos filamentosos, sistemas de expresión en células de mamífero), o pueden sintetizarse de forma química. Si el péptido GCRA o el péptido variante se va a producir en bacterias, por ejemplo en *E. coli*, la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido puede también codificar una secuencia líder que permite la secreción del polipéptido maduro de la célula. Por lo tanto, la secuencia que codifica el polipéptido puede incluir la presecuencia y la prosecuencia de, por ejemplo, un polipéptido ST bacteriano de origen natural. El polipéptido secretado maduro puede purificarse a partir del medio de cultivo.
- La secuencia codificante de un péptido GCRA descrito en el presente documento puede insertarse en un vector que tenga la capacidad 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 vector puede ser un ADN bacteriano o de bacteriófago, tal como bacteriófago lambda o M13, y derivados de los mismos. La construcción de un vector que contiene un ácido nucleico descrito en el presente documento puede estar seguida de la transformación de una célula hospedadora, tal como una bacteria. Los hospedadores bacterianos adecuados incluyen, pero sin limitación, *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Salmonella*. La construcción genética también incluye, además de la molécula de ácido nucleico codificante, elementos que permiten la expresión, tales como un promotor y secuencias reguladoras. Los vectores de expresión pueden contener secuencias de control transcripcional que controlan el inicio de la transcripción, tales como promotores, potenciadores, operadores y secuencias represoras.
- Los expertos en la materia conocen una diversidad de secuencias de control transcripcional. El vector de expresión puede también 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 tener la capacidad de replicación autónoma o puede integrarse en el ADN del hospedador para asegurar la estabilidad durante la producción del polipéptido.
- Para facilitar la purificación, la secuencia codificante de la proteína que incluye un péptido GCRA descrito en el presente documento, también puede fusionarse a un ácido nucleico que codifica una etiqueta de afinidad a polipéptido, por ejemplo, glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, proteína A, etiqueta FLAG, hexa-histidina, etiqueta myc o la etiqueta HA de influenza. La fusión de la etiqueta de afinidad o del indicador une la fase de lectura del polipéptido de interés a la fase de lectura del gen que codifica la etiqueta de afinidad, de forma que se genera una fusión traduccional. La expresión del gen de fusión da como resultado la traducción de un único polipéptido que incluye tanto el polipéptido de interés como la etiqueta de afinidad. En algunos casos, cuando se utilicen etiquetas de afinidad, se fusionará la secuencia de ADN que codifica un sitio de reconocimiento para proteasa entre las fases de lectura para la etiqueta de afinidad y el polipéptido de interés.
- Pueden también utilizarse para producir polipéptidos en un sistema biológico construcciones genéticas y métodos adecuados para la producción de las formas inmadura y madura de los péptidos GCRA y variantes descritos en el presente documento, en sistemas de expresión de proteínas que no sean bacterias, y bien conocidos para los expertos en la materia.

Los péptidos divulgados en el presente documento pueden modificarse mediante el ligamiento a una segunda molécula que confiere una propiedad deseada al péptido, tal como una semivida aumentada en el cuerpo, por ejemplo, pegilación. Tales modificaciones también están incluidas dentro del ámbito del término "variante" como se utiliza en el presente documento.

5

## MÉTODOS TERAPÉUTICOS

La presente invención proporciona métodos profilácticos y terapéuticos para el tratamiento de un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado que está mediado por los agonistas del receptor guanilato ciclasa. Los trastornos mediados por los agonistas del receptor guanilato ciclasa incluyen trastornos gastrointestinales, trastornos inflamatorios, trastornos pulmonares, cáncer, trastornos cardiacos, trastornos oculares, trastornos bucales, trastornos sanguíneos, trastornos hepáticos, trastornos cutáneos, trastornos de la próstata, trastornos endocrinos, aumento de la motilidad gastrointestinal y obesidad. Los trastornos gastrointestinales incluyen, por ejemplo, el síndrome del colon irritable (SCI), la dispepsia no ulcerosa, la pseudo obstrucción intestinal crónica, la dispepsia funcional, la pseudo obstrucción colónica, el reflujo duodenogástrico, la enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), íleo (por ejemplo, íleo posoperatorio), gastroparesis, acidez estomacal (alta acidez en el tracto GI), estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado con el uso de medicamentos tales como opioides, fármacos para la osteoartritis, fármacos para la osteoporosis; estreñimiento posquirúrgico, estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos. Los trastornos inflamatorios incluyen inflamación de tejidos y órganos, tales como inflamación del riñón (por ejemplo, nefritis), inflamación del aparato gastrointestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enterocolitis necrosante; inflamación pancreática (por ejemplo, pancreatitis), inflamación pulmonar (por ejemplo, bronquitis o asma) o inflamación cutánea (por ejemplo, psoriasis, eccema). Los trastornos pulmonares incluyen, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis. El cáncer incluye carcinogénesis de tejidos y órganos, incluyendo metástasis tal como, por ejemplo, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer intestinal, cáncer anal, cáncer hepático, cáncer de vesícula biliar o cáncer de colon; cáncer de pulmón; cáncer de tiroides; cáncer de piel (por ejemplo, melanoma); cáncer bucal; cáncer del tracto urinario (por ejemplo, cáncer de vejiga o cáncer de riñón); cáncer de células sanguíneas (por ejemplo, mieloma o leucemia) o cáncer de próstata. Los trastornos cardiacos incluyen, por ejemplo, insuficiencia cardiaca congestiva, hipertensión de cardias de la tráquea, colesterol alto o triglicéridos altos. Los trastornos hepáticos incluyen, por ejemplo, cirrosis y fibrosis. Los trastornos oculares incluyen, por ejemplo, tensión intraocular aumentada, glaucoma, ojos secos, degeneración retiniana, trastornos de las glándulas lagrimales o inflamación ocular. Los trastornos cutáneos incluyen, por ejemplo, xerosis. Los trastornos bucales incluyen, por ejemplo, boca seca (xerostomía), síndrome de Sjögren, enfermedades de la encía (por ejemplo, periodontitis) o bloqueo o mal funcionamiento del conducto de la glándula salival. Los trastornos de la próstata incluyen, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna (HPB). Los trastornos endocrinos incluyen, por ejemplo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, hipotiroidismo y fibrosis quística.

El término "tratamiento" se refiere a la reducción o alivio de los síntomas en un sujeto, a la prevención del empeoramiento o evolución de los síntomas y/o la prevención de la enfermedad en un sujeto que no está enfermo. Para un dado sujeto, la mejora de un síntoma, su empeoramiento, su regresión o evolución, puede determinarse mediante cualquier medida objetiva o subjetiva. La eficacia del tratamiento puede medirse como una mejora en la morbilidad o la mortalidad (por ejemplo, alargamiento de la curva de supervivencia para una población seleccionada). Por lo tanto, el tratamiento eficaz incluiría la terapia de la enfermedad existente, el control de la enfermedad ralentizando o deteniendo su evolución, la prevención de la aparición de la enfermedad, la reducción del número o gravedad de los síntomas, o una combinación de los mismos. El efecto puede mostrarse en un estudio controlado, utilizando uno o más criterios estadísticamente significativos.

El GMPc intracelular inducido por la exposición, por ejemplo, poniendo en contacto un tejido (por ejemplo, tejido gastrointestinal) o célula, a agonistas de GCRA. Los receptores de GC-C se expresan en todo el tracto GI comenzando por el esófago, duodeno, yeyuno, íleo, ciego y colon. Las líneas celulares de cáncer de colon humanas (T81, CaCo-2 y HT-29) también expresan receptores de GC-C. Por que induce se entiende un aumento en la producción de GMPc en comparación con un tejido o célula que no ha estado en contacto con un péptido GCRA o una variante. Los tejidos o células se ponen en contacto de forma directa con un péptido de GCRA o variante. Como alternativa, el péptido GCRA o variante se administra de forma sistémica. El péptido GCRA o variante se administra en una cantidad suficiente para aumentar la concentración intracelular de GMPc. La producción de GMPc se mide mediante un ensayo basado en células conocido en la técnica (25).

Los trastornos se tratan, previenen o alivian administrando a un sujeto, por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano que lo necesite, una dosis terapéuticamente eficaz de un péptido GCRA. Los péptidos GCRA pueden estar en una composición farmacéutica en forma farmacéutica unitaria, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La expresión "forma farmacéutica unitaria" se refiere a una entidad de suministro de fármaco individual, por ejemplo, un comprimido, cápsula, solución o formulación de inhalación. La cantidad de péptido presente debería ser suficiente para tener un efecto terapéutico positivo cuando se administra a un paciente (normalmente, entre 10 µg y 3 g). Lo que constituye un "efecto terapéutico positivo" dependerá de la afección particular que se trata e incluirá cualquier mejora significativa en una afección que un experto en la materia reconoce fácilmente.

Los péptidos GCRA pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes. Por ejemplo, los péptidos GCRA pueden administrarse en combinación con inhibidores de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc, tales como, por ejemplo, sulindaco sulfona, zaprinast, motapizona, vardenafil o sildenafil y, uno o más de otros agentes quimioterapéuticos; o fármacos antiinflamatorios tales como, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios esteroides y no esteroides (AINE), tales como la aspirina.

La terapia de combinación puede lograrse administrando dos o más agentes, por ejemplo, un péptido GCRA descrito en el presente documento y otro compuesto, cada uno de los cuales se formula y administra de forma separada, o administrando dos o más agentes en una formulación única. La terapia de combinación también abarca otras combinaciones. Por ejemplo, pueden formularse juntos y administrarse dos agentes en conjunción con una formulación distinta que contiene un tercer agente. Aunque los dos o más agentes en la terapia de combinación pueden administrarse de forma simultánea, no hay necesidad de ello. 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. Por lo tanto, los dos o más agentes pueden administrarse al cabo de minutos entre sí o al cabo de 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 o 24 horas entre sí, o al cabo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 días entre sí, o al cabo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas entre sí. En algunos casos son posibles incluso intervalos más prolongados. Aunque en muchos casos es conveniente 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 por qué ser así.

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden combinarse con inhibidores de la fosfodiesterasa, por ejemplo, sulindaco sulfona, Zaprinast, sildenafil, vardenafil o tadalafil, para potenciar adicionalmente los niveles de GMPc en los tejidos u órganos diana.

La terapia de combinación también puede incluir dos o más administraciones de uno o más de los agentes utilizados en la combinación. Por ejemplo, si el agente X y el agente Y se utilizan en combinación, se podrían administrar de forma secuencial en cualquier combinación de una o más veces, por ejemplo, en el orden X-Y-X, X-X-Y, Y-X-Y, Y-Y-X, X-X-Y-Y, etc.

La terapia de combinación también puede incluir la administración de uno de los agonistas de la GC-C con azotioprina y/u otros agentes inmunomoduladores. Los agentes inmunomoduladores pueden incluir fármacos de molécula pequeña y productos biológicos tales como Remicade, Humaira, Cimzia, etc.

La terapia de combinación también puede incluir la administración de dos o más agentes a través de distintas rutas o emplazamientos. Por ejemplo, (a) un agente se administra por vía oral y los otros agentes se administran por vía intravenosa o (b) un agente se administra por vía oral y el otro se administra por vía local. En cada caso, los agentes pueden ser simultáneos o secuenciales. Las dosificaciones aproximadas para algunos de los agentes de la terapia de combinación descritos en el presente documento se encuentran en "BNF Recommended Dose", columna de las tablas de las páginas 11-17 del documento WO01/76632 (atribuyéndose los datos en las tablas al March 2000 British National Formulary) y también pueden encontrarse en otros formularios convencionales y otros directorios sobre prescripción de fármacos. Para algunos fármacos, la dosis prescrita habitual para una indicación variará en un tanto de país en país.

Los péptidos GCRA, solos o en combinación, pueden combinarse con cualquier transportador o medio farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, pueden combinarse con materiales que no producen una reacción adversa, alérgica o de otro modo no deseada cuando se administran a un paciente. Los transportadores o medios utilizados pueden incluir disolventes, dispersantes, recubrimientos, agentes que estimulan la absorción, agentes de liberación controlada y uno o más excipientes inertes (que incluyen almidones, polioles, agentes de granulación, celulosa microcristalina (por ejemplo, celphere, Celphere beads®), diluyentes, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares), etc. Si se desea, las dosificaciones en comprimido de las composiciones divulgadas pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas convencionales.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía pretendida de administración. Los ejemplos de vías de administración incluyen la parenteral, por ejemplo, la intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y la administración rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas descartables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones (donde son solubles en agua) o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen

solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe estar estéril y debería ser fluida al punto de que exista una inyectabilidad fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse frente la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El transportador puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- 5
- 10
- 15 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (por ejemplo, un agonista de GCRA) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado, con uno, o una combinación, de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el desecado al vacío y el liofilizado, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado, a partir de una solución previamente filtrada de forma estéril.
- 20

En general, las composiciones orales incluyen un diluyente inerte o un transportador comestible. Tales como manitol, fructooligosacáridos, polietilenglicol y otros excipientes. Pueden estar contenidos en cápsulas de gelatina o comprimidos en comprimidos. Para el fin de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en la forma de comprimido, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un transportador fluido para su uso como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el transportador fluido se aplica por vía oral y se hace un enjuague y se escupe, o se traga. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes. Los comprimido, píldoras, cápsulas, trociscos y similares, pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido alginico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, metil salicilato o aromatizante de naranja.

- 25
- 30
- 35

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se suministran en la forma de pulverización en aerosol a partir de un envase o dosificador que contenga un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

- 40

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes se conocen en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal puede conseguirse a través del uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas, como se conoce en general en la técnica.

- 45

Los compuestos también pueden prepararse en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

- 50

En una realización, los compuestos activos se preparan con transportadores que protegerán al compuesto frente a la eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán obvios para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse de forma comercial de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos víricos) también pueden utilizarse como transportadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 4.522.811.

- 55
- 60

Para la facilidad en la administración y uniformidad de la dosificación es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en formas farmacéuticas unitarias. Forma farmacéutica unitaria, como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas ajustadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para

- 65

producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el transportador farmacéutico necesario. La especificación de las formas farmacéuticas unitarias de la invención se establece por, y depende directamente de, las características exclusivas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a lograr.

- 5 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dosificador, junto con instrucciones para la administración.

10 Las composiciones de la presente invención pueden incluir también, de forma opcional, otros ingredientes terapéuticos, agentes antiapelmazantes, conservantes, agentes edulcorantes, colorantes, saborizantes, desecantes, plastificantes, colorantes, emolientes, antiadherentes, agentes antiestática, tensioactivos (agentes de humectación), antioxidantes, agentes de recubrimiento en película y similares. Cualquiera de tales ingredientes opcionales puede ser compatible con el compuesto descrito en el presente documento, para asegurar la estabilidad de la formulación.

15 La composición puede contener otros aditivos según se necesario, incluyendo, por ejemplo, lactosa, glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, maltitol, melezitosa, estaquirosa, lactitol, palatinita, almidón, xilitol, manitol, mioinositol, y similares, e hidratos de los mismos, y aminoácidos, por ejemplo, alanina, glicina y betaína, y polipéptidos y proteínas, por ejemplo albúmina.

20 Los ejemplos de excipientes para su uso como los transportadores farmacéuticamente aceptables, y los transportadores inertes farmacéuticamente aceptables y los ingredientes adicionales anteriormente mencionados incluyen, pero sin limitación, aglutinantes, rellenos, disgregantes, lubricantes, agentes microbianos y agentes de recubrimiento tales como: AGLUTINANTES: almidón de maíz, almidón de patata, otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como arábica, de xantano, alginato de sodio, ácido alginico, otros alginatos, de tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio), polivinilpirrolidona (por ejemplo, povidona, crospovidona, copovidona, etc.), metilcelulosa, Methocel, almidón pregelatinizado (por ejemplo, STARCH 1500® y STARCH 1500 LM®, vendido por Colorcon, Ltd.), hidroxipropilmetil celulosa, celulosa microcristalina (FMC Corporation, Marcus Hook, PA, EE. UU.), o mezclas de los mismos, RELLENOS: talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), fosfato dibásico de calcio, fosfato tribásico de calcio, sulfato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, dextrosa, fructosa, miel, lactosa anhidra, monohidrato de lactosa, lactosa y aspartamo, lactosa y celulosa, lactosa y celulosa microcristalina, maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcristalina y amp; goma guar, melaza, sacarosa o mezclas de los mismos, DISGREGANTES: agar-agar, ácido alginico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa de sodio, crospovidona, poliacrilina de potasio, almidón glicolato de sodio, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pregelatinizado, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas (como gellan), hidroxipropil celulosa de baja sustitución, o mezclas de los mismos, LUBRICANTES: estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, laurilsulfato de sodio, estearil fumarato de sodio, lubricantes de ácidos grasos de base vegetal, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de zinc, etil oleato, etil laurato, agar, gel de sílice syloid (AEROSIL 200, W.R. Grace Co., Baltimore, MD, EE. UU.), un aerosol coagulado de sílice sintético (Deaussa Co., Piano, TX USA), un dióxido de silicio pirogénico (CAB-O-SIL, Cabot Co., Boston, MA, EE. UU.), o mezclas de los mismos, AGENTES ANTIAPELMAZANTES: silicato de calcio, silicato de magnesio, dióxido de silicio, dióxido de silicio coloidal, talco o mezclas de los mismos, AGENTES ANTIMICROBIANOS: cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, butilparabeno, cloruro de cetilpiridinio, cresol, clorobutanol, ácido deshidroacético, etilparabeno, metilparabeno, fenol, alcohol feniletílico, fenoxietanol, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, sorbato de potasio, propilparabeno, benzoato de sodio, deshidroacetato de sodio, propionato de sodio, ácido ascórbico, timerosal, thymo, o mezclas de los mismos, AGENTES DE RECUBRIMIENTO: carboximetilcelulosa de sodio, acetato ftalato de celulosa, etilcelulosa, gelatina, esmalte farmacéutico, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa), hidroxipropilmetilcelulosa ftalato, metilcelulosa, polietilenglicol, acetato de polivinilo ftalato, goma laca, sacarosa, dióxido de titanio, cera carnauba, cera microcristalina, goma gellan, maltodextrina, metacrilatos, celulosa microcristalina y carragenano, o mezclas de los mismos.

55 La formulación también puede incluir otros excipientes y categorías de los mismos que incluyen, pero sin limitación, L-histidina, Pluronic®, Poloxameros (tales como Lutrol® y Poloxamero 188), ácido ascórbico, glutatién, potenciadores de la permeabilidad (por ejemplo, lípidos, colato de sodio, acilcarnitina, salicilatos, sales biliares en mezcla, micelas de ácidos grasos, quelantes, ácidos grasos, tensioactivos, glicéridos de cadena media), inhibidores de proteasas (por ejemplo, inhibidores de tripsina de soja, ácidos orgánicos), agentes reductores del pH y potenciadores de la absorción eficaces para estimular la biodisponibilidad (que incluyen, pero sin limitación, los descritos en el documento US6086918 y US5912014), cremas y lociones (como maltodextrina y carragenanos); materiales para comprimidos masticables (como dextrosa, fructosa, monohidrato de lactosa, lactosa y aspartamo, lactosa y celulosa, maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcristalina y goma guar, sorbitol cristalino); parenterales (como manitol y povidona); plastificantes (como sebacato de dibutilo, plastificantes para recubrimientos, ftalato de acetato de polivinilo); lubricantes en polvo (como behenato de glicerilo); cápsulas de gelatina blanda (como solución especial de sorbitol); esferas para recubrimiento (como esferas de azúcar); agentes de esferonización

(como behenato de glicerilo y celulosa microcristalina); agentes de suspensión/gelificantes (como carragenano, goma gellan, manitol, celulosa microcristalina, povidona, almidón glicolato de sodio, goma de xantano); edulcorantes (aspartamo, aspartamo y lactosa, dextrosa, fructosa, miel, maltodextrina, maltosa, manitol, melazas, sorbitol cristalino, solución especial de sorbitol, sacarosa); agentes de granulación húmedos (como carbonato de calcio, lactosa anhidra, monohidrato de lactosa, maltodextrina, manitol, celulosa microcristalina, povidona, almidón), caramelo, carboximetilcelulosa de sodio, sabor de crema de cereza y sabor de cereza, ácido cítrico anhidro, ácido cítrico, azúcar de pastero, D&C Rojo N.º 33, D&C Amarillo N.º 10 laca de aluminio, edetato de disodio, alcohol etílico al 15 %, FD&C Amarillo N.º 6 laca de aluminio, , FD&C Azul N.º 1 laca de aluminio, FD&C Azul N.º 1, FD&C Azul N.º 2 laca de aluminio, FD&C Verde N.º 3, FD&C Rojo N.º 40, FD&C Amarillo N.º 6 laca de aluminio, FD&C Amarillo N.º 6, FD&C Amarillo N.º 10, palmitoestearato de glicerol, monoestearato de glicerilo, carmín de índigo, lecitina, manitol, metil y propil parabenos, glicirricinato de monoamonio, sabor de naranja natural y artificial, esmalte farmacéutico, poloxámero 188, polidextrosa, polisorbato 20, polisorbato 80, polividona, almidón de maíz pregelatinizado, almidón pregelatinizado, óxido de hierro rojo, sacarina de sodio, carboximetiléter de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio, sabor de fresa, óxido de hierro negro sintético, óxido de hierro rojo sintético, dióxido de titanio y cera blanca.

Las formas farmacéuticas orales sólidas pueden tratarse de forma opcional con sistemas de recubrimiento (por ejemplo, sistema de recubrimiento en película Opadry® fx, por ejemplo Opadry® blue (OY-LS-20921), Opadry® white (YS-2-7063), Opadry® white (YS-1-7040) y tinta negra (S-1-8 106).

Los agentes, en su forma libre o como una sal, pueden combinarse con un polímero tal como ácido poliláctico-glicólico (PLGA), ácido poli-(l)-láctico-glicólico-tartárico (P(l)LGTT) (documento WO 01/12233), ácido poliglicólico (documento US 3.773.919), ácido poliláctico (documento US 4.767.628), poli(ε-caprolactona) y poli(óxido de alquileno) (documento US 20030068384), para crear una formulación de liberación sostenida. Tales formulaciones pueden utilizarse en implantes que liberan un polipéptido u otro agente activo a lo largo de un período de varios días, unas varias semanas o varios meses dependiendo del polímero, el tamaño de partícula del polímero y el tamaño del implante (véase, por ejemplo, el documento US 6.620.422). Otras formulaciones de liberación sostenida y polímeros para su uso se describen en los documentos EP 0 467 389 A2, WO 93/24150, US 5.612.052, WO 97/40085, WO 03/075887, WO 01/01964A2, US 5.922.356, WO 94/155587, WO 02/074247A2, WO 98/25642, US 5.968.895, US 6.180.608, US 20030171296, US 20020176841, US 5.672.659, US 5.893.985, US 5.134.122, US 5.192.741, US 5.192.741, US 4.668.506, US 4.713.244, US 5.445.832 US 4.931.279, US ,5.980.945, WO 02/058672, WO 9726015, WO 97/04744 y US200200 19446. En tales formulaciones de liberación sostenida las micropartículas (Delie y Blanco-Prieto 2005 Molecule 10:65-80)) de polipéptido se combinan con micropartículas de polímero. Pueden colocarse uno o más implantes de liberación sostenida en el intestino grueso, el intestino delgado o en ambos. Los documentos US 6.011.0 1 y el documento WO 94/06452 describen una formulación de liberación sostenida que proporciona polietilenglicoles (es decir, PEG 300 y PEG 400) o triacetina. El documento WO 03/053401 describe una formulación que puede potenciar la biodisponibilidad y proporcionar la liberación controlada del agente dentro del tracto GI. Se describen formulaciones de liberación controlada adicionales en los documentos WO 02/38129, EP 326151, US 5236.704, WO 02/30398, WO 98/13029; US 20030064105, US 20030138488A1, US 20030216307A1, US 6.667.060, WO 01/49249, WO 01/49311, WO 01/49249, WO 01/49311 y US 5,877,224, materiales que pueden incluir los descritos en el documento WO04041195 (que incluye el sello y el recubrimiento gastrorresistente descritos allí) y recubrimientos sensibles a pH que logran el suministro en el colon, incluyendo los descritos en los documentos US4.910.021 y WO9001329. El documento US4910021 describe el uso de un material sensible a pH para recubrir una cápsula. El documento WO9001329 describe el uso de recubrimientos sensibles a pH sobre perlas que contienen ácido, en donde el ácido en el núcleo de la perla prolonga la disolución del recubrimiento sensible a pH. La Patente de Estados Unidos N.º 5.175.003 divulga una mezcla polimérica de mecanismo doble compuesta de materiales gastrorresistente sensibles a pH y plastificantes formadores película que tienen la capacidad de conferir permeabilidad al material gastrorresistente, para su uso en sistemas de suministro de fármacos; un gránulo de matriz compuesto de una mezcla polimérica de mecanismo doble impregnada con un fármaco y que en ocasiones recubre un núcleo farmacéuticamente neutro; un gránulo recubierto de membrana que comprende un gránulo de matriz recubierto con una envoltura de mezcla polimérica de mecanismo doble de la misma o distinta composición y una forma farmacéutica que contiene gránulos de matriz. El gránulo de matriz libera fármacos solubles en ácido por difusión en pH ácido y por desintegración a niveles de pH de forma nominal de aproximadamente 5,0 o mayores.

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden formularse en sistemas de liberación controlada dirigidos desencadenados por pH descritos en el documento WO04052339. Los agentes descritos en el presente documento pueden formularse de acuerdo con la metodología descrita en cualquiera de los documentos WO03105812 (polímeros hidratables extruidos); WO0243767 (translocadores de membrana escindibles por enzimas); WO03007913 y WO03086297 (sistemas mucoadhesivos); WO02072075 (formulación laminada de bicapa que comprende un agente reductor del pH y un potenciador de la absorción); WO04064769 (polipéptidos amidados); WO05063156 (suspensión lipídica sólida con propiedades seudotrópicas y/o tixotrópicas tras la fusión); WO03035029 y WO03035041 (formas farmacéuticas de retención gástrica erosionables); US5007790 y US5972389 (formas farmacéuticas de liberación sostenida); WO041 1271 1 (composiciones orales de liberación prolongada); WO05027878, WO02072033 y WO02072034 (composiciones de liberación retardada con goma natural o sintética); WO05030182 (formulaciones de liberación controlada con una tasa ascendente de liberación); WO05048998 (sistema de microencapsulación); Patente de Estados Unidos 5.952.314 (biopolímero); US5.108.758 (suministro de

matriz de amilosa vítrea); US5.840.860 (suministro a base de almidón modificado). Documento JP10324642 (sistema de suministro que comprende quitosano y material resistente gástrico tal como gliadina de trigo o zeína); US5.866.619 y US6.368.629 (polímero que contiene sacáridos); US 6.531.152 (describe un sistema de suministro de fármacos que contiene un núcleo soluble en agua (pectinato de Ca u otros polímeros insolubles en agua) y una cubierta externa que se rompe (por ejemplo, polímero hidrófobo-Eudragit)); US 6.234.464; US 6.403.130 (recubrimiento con polímero que contiene caseína y metoxi pectina alta; WO0174 175 (producto de reacción Maillard); WO05063206 (formulación de aumento de la solubilidad); WO040 19872 (proteínas de fusión de transferencia)).

10 Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden formularse utilizando la tecnología sistema de retención gastrointestinal (GIRES (acrónimo de *gastrointestinal retention system*); Merrion Pharmaceuticals). GIRES comprende una forma farmacéutica de liberación controlada dentro de una bolsa inflable, que se coloca en una cápsula farmacológica para la administración oral. Tras la disolución de la cápsula, un sistema que genera gas infla la bolsa en el estómago, en donde se retiene durante 16-24 horas, liberando durante todo ese tiempo los agentes descritos en el presente documento.

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden formularse en un dispositivo osmótico que incluye los descritos en los documentos US4.503.030, US5.609.590 y US5.358.502. El documento US4.503.030 divulga un dispositivo osmótico para dispensar un fármaco a determinadas regiones de pH del tracto gastrointestinal. De forma más particular, la invención se refiere a un dispositivo osmótico que comprende una pared formada de una composición sensible a pH semipermeable que rodea un compartimiento que contiene un fármaco, con un pasaje a través de la pared que conecta el exterior del dispositivo con el compartimiento. El dispositivo suministra el fármaco a una velocidad controlada en la región del tracto gastrointestinal que tiene un pH de menos de 3,5, y el dispositivo se autodestruye y libera todo su fármaco en la región del tracto gastrointestinal que tiene un pH mayor que 3,5, proporcionando de este modo la disponibilidad total para la absorción del fármaco. Las Patentes de Estados Unidos N.º 5.609.590 y 5.358.502 divulgan un dispositivo de ruptura osmótica para dispensar un agente beneficioso a un entorno acuoso. El dispositivo comprende un agente beneficioso y un osmoagente rodeados, al menos en parte, por una membrana semipermeable. El agente beneficioso también puede funcionar como el osmoagente. La membrana semipermeable es permeable al agua y sustancialmente impermeable al agente beneficioso y al osmoagente. Se acopla un medio accionador a la membrana semipermeable (por ejemplo, una dos mitades de cápsula). El medio accionador se activa por un pH de 3 a 9 y acciona el suministro eventual, pero repentino, del agente beneficioso. Estos dispositivos permiten la liberación accionada por pH del núcleo del agente beneficioso como un bolo mediante ruptura osmótica.

### 35 AGENTES EJEMPLARES PARA LA TERAPIA DE COMBINACIÓN

#### *Agentes analgésicos*

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en la terapia de combinación con un agente analgésico, por ejemplo, un compuesto analgésico o un polipéptido analgésico. Estos polipéptidos y compuestos pueden administrarse con los péptidos GCRA descritos en el presente documento (de forma simultánea o secuencial). De forma opcional pueden estar enlazados o ligados de forma covalentemente a un agente descrito en el presente documento para crear conjugados terapéuticos. Entre los agentes analgésicos útiles están: bloqueantes del canal Ca, antagonistas del receptor 5HT (por ejemplo, antagonistas de los receptores 5HT3, 5HT4 y 5HT1), agonistas del receptor de opioides (loperamida, fedotozina y fentanilo), antagonistas del receptor NK1, agonistas del receptor CCK (por ejemplo, loxiglumida), antagonistas del receptor NK1, antagonistas del receptor NK3, inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina (IRNS), agonistas de los receptores de vanilloides y cannabinoideas, y sialorfina. Los agentes analgésicos en las diversas clases se describen en la bibliografía.

50 Entre los polipéptidos analgésicos útiles están los polipéptidos relacionados con la sialorfina, que incluyen los que comprenden la secuencia de aminoácidos QHNPR (SEQ ID NO:), incluyendo: VQHNPR (SEQ ID NO:); VRQHNPR (SEQ ID NO:); VRGQHNPR (SEQ ID NO:); VRGPQHNPR (SEQ ID NO:); VRGPRQHNPR (SEQ ID NO:); VRGPRRQHNPR (SEQ ID NO:) y RQHNPR (SEQ ID NO:). Los polipéptidos relacionados con la sialorfina se unen a neprilesina e inhiben la descomposición mediada por neprilesina de la sustancia P y Met-enkefalina. Por lo tanto, los compuestos o polipéptidos que son inhibidores de la neprilesina son agentes analgésicos útiles que pueden administrarse con los polipéptidos descritos en el presente documento en una coterapia o unirse con los polipéptidos descritos en el presente documento, por ejemplo, mediante enlaces covalentes. La sialorfina y los polipéptidos relacionados se describen en la Patente de Estados Unidos 6.589.750; el documento US 20030078200 A1 y el documento WO 02/051435 A2.

Los antagonistas y agonistas de los receptores de opioides se pueden administrar con los péptidos GCRA descritos en el presente documento en una coterapia o unidos al agente descrito en el presente documento, por ejemplo, mediante un enlace covalente. Por ejemplo, se cree que en el tratamiento del SCI son útiles los antagonistas del receptor de opioides tales como naloxona, naltrexona, metil nalozona, nalmefeno, cipridima, beta funaltrexamina, naloxonazina, naltrindol y nor-binaltorfimina. Puede ser útil para formular antagonistas de opioides de este tipo una formulación de liberación retardada y sostenida, de forma que la liberación inicial del antagonista esté en el intestino

delgado medio a distal y/o en el colon ascendente. Tales antagonistas se describen en el documento WO 01/32180 A2. El pentapéptido encefalina (HOE825, Tyr-D-Lys-Gly-Phe-L-homoserina) es un agonista de los receptores de opioides mu y delta, y se cree que es útil para aumentar la motilidad intestinal (Eur. J. Pharm. 219:445, 1992), y este polipéptido puede utilizarse junto con los polipéptidos descritos en el presente documento. También es útil la

5 trimebutina, la cual se cree que se une a los receptores de opioides mu/delta/kappa y activa la liberación de la motilina y modula la liberación de gastrina, polipéptido intestinal vasoactivo, gastrina y los glucagones. Los agonistas de receptores de opioides Kappa, tales como fedotozina, asimadolina y la cetociclazocina, y los compuestos descritos en los documentos WO03/097051 y WO05/007626, pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento. Además, pueden utilizarse los agonistas del receptor de opioides mu tales

10 como morfina, difeniloxilato, frakefamida (H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH<sub>2</sub>; documento WO 01/019849 A1) y loperamida.

Tyr-Arg (quitorfina) es un dipéptido que actúa estimulando la liberación de metencefalinas para producir un efecto analgésico (J. Biol. Chem 262:8165, 1987). La quitorfina puede utilizarse con, o unirse a, los péptidos GCRA descritos en el presente documento.

15

El polipéptido derivado de la cromogranina (CgA 47-66; véase, por ejemplo, Ghia *et al.*, 2004 Regulatory polypeptides 119:199) puede utilizarse con, o unirse a, los péptidos GCRA descritos en el presente documento.

20 Los agonistas del receptor CCK tales como la caeruleina de anfibios y otras especies, son agentes analgésicos útiles que pueden utilizarse con, o unirse a, los péptidos GCRA descritos en el presente documento.

Los polipéptidos de canotoxina representan una clase grande de polipéptidos analgésicos que actúan en los canales de calcio regulados por voltaje, los receptores de NMDA o los receptores nicotínicos. Estos polipéptidos pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento.

25

Los análogos peptídicos de la timulina (solicitud FR 2830451) pueden tener actividad analgésica y pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento.

30 Los agonistas del receptor CCK (CCKa o CCKb), que incluyen loxiglumida y dexloxiglumida (el isómero R de loxiglumida) (documento WO 88/05774), pueden tener actividad analgésica y pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento.

Otros agentes analgésicos útiles incluyen agonistas de 5-HT<sub>4</sub> tales como tegaserod (Zelnorm®), mosaprida, metoclopramida, zacoprida, cisaprida, renzaprida, derivados de bencimidazol tales como BIMU 1 y BIMU 8, y lorexaprida. Tales agonistas se describen en los documentos: EP1321 142 A1, WO 03/053432A1, EP 505322 A1, EP 505322 B1, US 5.510.353, EP 507672 A1, EP 507672 B1 y US 5.273.983.

35

Los bloqueantes del canal de calcio tales como ziconotida y los compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, los documentos EP 625162B1, 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, pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento.

40

45 Pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento diversos antagonistas de los receptores NK-1, NK-2 y NK-3 (para una revisión véase Giardina *et al.*, 2003.Drugs 6:758).

Los antagonistas del receptor NK1, 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 los compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, los documentos EP 873753 A1, US 20010006972 A1, US 20030109417 A1, WO 01/52844 A1, pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento.

50

Los antagonistas del receptor NK-2, tales como nepadutant ((Menarini Ricerche SpA), saredutant (Sanofi-Synthelabo), GW597599 (Glaxo Smith Kline), SR-144190 (Sanofi-Synthelabo) y UK-290795 (Pfizer Inc), pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento.

55

Los antagonistas del receptor NK3 tales como osanetant (SR-142801; Sanofi-Synthelabo), SSR-241586, talnetant y los 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), pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento.

60

Pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento los inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina (IRNS), tales como milnaciprán y los compuestos relacionados descritos en el documento WO 03/077897 A1.

65

Pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento los antagonistas de receptor de vanilloides, tales como arvanil y los compuestos relacionados descritos en el documento WO 01/64212 A1.

5 Los polipéptidos y compuestos analgésicos pueden administrarse con los polipéptidos y agonistas descritos en el presente documento (de forma simultánea o secuencial). Los agentes analgésicos pueden unirse también, de forma covalente, a los polipéptidos y agonistas descritos en el presente documento, para crear conjugados terapéuticos. Cuando el analgésico es un polipéptido y está unido de forma covalente a un agente descrito en el presente documento, el polipéptido resultante también puede incluir al menos un sitio de escisión para tripsina. Cuando está presente dentro del polipéptido, el polipéptido analgésico puede estar precedido por (si está en el extremo carboxilo),  
10 o seguido por (si está en el extremo amino), un sitio de escisión para tripsina que permita la liberación del polipéptido analgésico.

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

15

#### *Agentes para tratar trastornos gastrointestinales*

Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales para tratar trastornos gastrointestinales y otros incluyen agentes para tratar el estreñimiento (por ejemplo, un activador del canal de cloruro tal como el ácido graso bicíclico, Lubiprostona (anteriormente conocida como SPI-0211, Sucampo Pharmaceuticals, Inc. Bethesda, MD), un laxante (por ejemplo, un laxante formador de masa (por ejemplo, polisacáridos que no son almidón, Comprimido Colonal (policarbofilo de calcio), Plantago Ovata®, Equalactin® (policarbofilo de calcio)), fibra (por ejemplo, FIBERCON® (policarbofilo de calcio), un laxante osmótico, un laxante estimulante (tal como difenilmetanos (por ejemplo, bisacodilo), antraquinonas (por ejemplo, cáscara, senna) y laxantes tensioactivos (por ejemplo, aceite de ricino, docusatos), un agente emoliente/lubricante (tal como aceite mineral, glicerina y docusatos) MiraLax (Braintree Laboratories, Braintree MA), dexloxiglumida (Forest Laboratories, también conocido como CR 2017 Rottapharm (Rotta Research Laboratorium SpA)), laxantes salinos, enemas, supositorios y CR 3700 (Rottapharm (Rotta Research Laboratorium SpA); agentes inhibidores de la secreción ácida, tales como los inhibidores de la bomba de protones (por ejemplo, omeprazol (Prilosec®), esomeprazol (Nexium®), lansoprazol (Prevacid®), pantoprazol (Protonix®) y rabeprazol (Aciphex®)) y agonistas del receptor de la Histamina H2 (también conocido como bloqueantes del receptor de H2, que incluyen cimetidina, ranitidina, famotidina y nizatidina); agentes procinéticos que incluyen itoprida, octreotida, betanecol, metoclopramida (Reglan®), domperidona (Motilium®), eritromicina (y derivados de la misma) o cisaprida (propulsid®); homólogos de polipéptidos de procinética, variantes y quimeras de los mismos, incluyendo los descritos en el documento US 7.052.674, los cuales pueden utilizarse con, o unirse a, los polipéptidos descritos en el presente documento; agentes promotilidad tales como el polipéptido derivado de la vasostatina, cromogranina A (4-16) (véase, por ejemplo, Ghia *et al.* 2004 Regulatory polypeptides 121:31) o agonistas de la motilina (por ejemplo, GM-611 o fumarato de mitemcinal) o moduladores del receptor de nociceptina/Orfanina FQ documento (US200501 69917); otros péptidos que pueden unirse a, y/o activar, la GC-C, incluyendo los descritos en el documento US20050287067; agonistas o antagonistas completos o parciales del receptor 5HT (por ejemplo, 5HT1, 5HT2, 5HT3, 5HT4) (incluyendo antagonistas de 5HT1A (por ejemplo, AG1-OO1 (AGI therapeutics), antagonistas de 5HT2B (por ejemplo, PGN 1091 y PGN1 164 (Pharmagene Laboratories Limited) y agonistas del receptor 5HT4 (tales como tegaserod (ZELNORM®), prucaloprida, mosaprida, metoclopramida, zacoprida, cisaprida, renzaprida, derivados de benzimidazolona tales como BIMU 1 y BIMU 8, y lirexaprida). Tales agonistas/moduladores se describen en los documentos: EP1321142 A1, WO 03/053432A1, EP 505322 A1, EP 505322 B1, US 5.510.353, EP 507672 A1, EP 507672 B1, US 5.273.983 y US 6.951.867); agonistas del receptor 5HT3 tales como MKC-733 y antagonistas del receptor 5HT3 tales como DDP-225 (MCI-225, Dynogcn Pharmaceuticals, Inc.), cilansetrón (Calmactin®), alosetrón (Lotronex®), Ondansetrón HCl (Zofran®), Dolansetrón (ANZEMET®), palonosetrón (Aloxi®), Granisetrón (Kytril®), YM060 (ramosetrón; Astellas Pharma Inc.; romasetrón se pueden proporcionar como una dosis diaria de 0,002 a 0,02 mg, como se describe en el documento EP01588707) y ATI-7000 (Aryx Therapeutics, Santa Clare CA); agonistas del receptor muscarínico; agentes antiinflamatorios; antiespasmódicos que incluyen, pero sin limitación, fármacos anticolinérgicos (como la dicitolmina) (por ejemplo, Colimex®, Formulex®, Lomine®, Protlyol®, Visceral®, Spasmoban®, Bently®, Bentlyol®), hiosciamina (por ejemplo, IB-Stat®, Nulev®, Levsin®, Levbid®, Levsinex Timecaps®, Levsin/SL®, Anaspoz®, A-Spas S/L®, Cystospaz®, Cystospaz-M®, Donnamar®, Colidrops Liquid Pediatric®, Gastrosed®, Hyco Elixir®, Hyosol®, Hyospaz®, Hyosyne®, Losamine®, Medispaz®, Neosol®, Spacol®, Spasdel®, Symax®, Symax SL®), Donnatal (por ejemplo, Donnatal® Extentabs), clidinio (por ejemplo, Quarzan, en combinación de Librium = Librax), metantolina (por ejemplo, Banthina), Mepenzolato (por ejemplo, Cantil), homotropina (por ejemplo, hycodan, Homapina), bromuro de propantelina (por ejemplo, Pro-Banthina), Glucopirrolato (por ejemplo, Robinul®, Robinul Forte®), escopolamina (por ejemplo, Transderm-Scop®, Transderm-V®), hiosina-N-butylbromuro (por ejemplo, Buscopan®), Pirenzepina (por ejemplo, Gastrozepin®), Bromuro de Propantelina (por ejemplo, Propanthel®), dicitloverina (por ejemplo, Merbentyl®), bromuro de glucopirronio (por ejemplo, Glycopyrrolate®), hidrobromuro de hioscina, metobromuro de hioscina, metantelinio y octatropine); aceite de menta y relajantes del músculo liso directos como bromuro de cimetropio, mebeverina (DUSPATAL®, DUSPATALIN®, COLOFAC MR®, COLOTAL®), bromuro de otilonio (octilonio), pinaverio (por ejemplo, Dicletel® (bromuro de pinaverio, Solvay SA)), Spasfon® (floroglucinol hidratado y trimetilfloroglucinol) y trimebutina (que incluye maleato de trimebutina (Modulon®)), antidepresivos, que incluyen, pero sin limitación, los enumerados en el presente documento, así como antidepresivos tricíclicos como amitriptilina

(Elavil®), desipramina (Norpramin®), imipramina (Tofranil®), amoxapina (Asendin®), nortriptilina, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (los ISRS), como paroxetina (Paxil®), fluoxetina (Prozac®), sertralina (Zoloft®) y citralopram (Celexa®), y otros como doxepina (Sinequan®) y trazodona (Desyrel®); agentes analgésicos que actúan de forma central, tales como agonistas del receptor de opioides, antagonistas del receptor de opioides (por ejemplo, naltrexona); agentes para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal; agentes para el tratamiento de la enfermedad de Crohn y/o la colitis ulcerosa (por ejemplo, alequel (Enzo Biochem, Inc., Farmingsale, NY); el polipéptido antiinflamatorio RDP58 Genzyme, Inc.; Cambridge, MA) y TRAFICET-EN™ (ChemoCentryx, Inc.; San Carlos, CA); agentes que tratan el dolor gastrointestinal o visceral; agentes que aumentan los niveles de GMPc (como se describe en el documento US20040121994) como los antagonistas del receptor adrenérgico, agonistas del receptor de dopamina e inhibidores de la PDE (fosfodiesterasa), que incluyen, pero sin limitación, los divulgados en el presente documento; purgantes que extraen fluidos al intestino (por ejemplo, VISICOL®, una combinación de fosfato de sodio monobásico monohidrato y fosfato de sodio dibásico anhidro); antagonistas del receptor del factor de liberación de corticotropina (FLC) (que incluye NBI-34041 (Neurocrine Biosciences, San Diego, CA), CRH9-41, astresina, R121919 (Janssen Pharmaceutical), CP154.526, NBI-27914, Antalarmina, DMP696 (Bristol-Myers Squibb), CP-316.311 (Pfizer, Inc.), SB723620 (GSK), GW876008 (Neurocrine/Glaxo Smith Kline), ONO-2333Ms (Ono Pharmaceuticals), TS-041 (Janssen), AAG561 (Novartis) y los divulgados en los documentos US 5.063.245, US 5.861.398, US20040224964, US20040198726, US20040176400, US20040171607, US20040110815, US20040006066 y US20050209253); polipéptidos similares a glucagón (glp-1) y análogos de los mismos (que incluyen exendina 4 y GTP-010 (Gastrotech Pharma A)) e inhibidores de DPP-IV (DPP-IV media la inactivación de glp-1); tofisopam, R-tofisopam enantioméricamente puro y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos (documento US 20040229867); antidepresivos tricíclicos del tipo de dibenzotiazepina, incluyendo, pero sin limitación Dextofisopam® (Vela Pharmaceuticals), tianeptina (Stablon®) y otros agentes descritos en el documento US 6.683.072; (E)-4-(ácido 1, 3bis (ciclohexilmetil)-1,2,3,4-tetrahidro-2,6-diono-9H-purin-8-il)cinámico nonaetilen glicol metil éter éster y compuestos relacionados descritos en el documento WO 02/067942; el probiótico PROBACTRIX® (The BioBalance Corporation, Nueva York, NY) que contiene microorganismos útiles en el tratamiento de trastornos gastrointestinales; fármacos antidiarreicos que incluyen, pero sin limitación, loperamida (Imodium, Pepto Diarrea), difenoxilato con atropina (Lomotil, Lomocot), colestiramina (Questran, Cholybar), atropina (Co-Phenotrope, Diarsed, Difenoxilato, Lofene, Logen, Lonox, Vi-Atro, inyección de sulfato de atropina) y Xifaxan® (rifaximina; Salix Pharmaceutical Ltd), TZP-201 (Tranzyme Pharma Inc.), el bloqueante del receptor de acetilcolina neuronal (nAChR) AGI-004 ((AGI therapeutics) y subsalicilato de bismuto (Pepto-bismol); fármacos ansiolíticos que incluyen, pero sin limitación, Ativan (lorazepam), alprazolam (Xanax®), clordiazepóxido/clidinio (Librium®, Librax®), clonazepam (Klonopin®), clorazepato (Tranxene®), diazepam (Valium®), estazolam (ProSom®), flurazepam (Dalmane®), oxazepam (Serax®), prazepam (Centrax®), temazepam (Restoril®), triazolam (Halcion®; Bedelix® (Montmorillonita beidellítica; Ipsen Ltd), Solvay SLV332 (ArQuic Inc), YKP (SK Parma), Asimadolina (Tioga Pharmaceuticals/Merek), AGI-003 (AGI Therapeutics); antagonistas de la neuroquinina que incluyen los descritos en el documento US2006004-0950; moduladores del canal de potasio que incluyen los descritos en el documento US7.002.015; el modulador de la serotonina AZD7371 (AstraZeneca Plc); antagonistas del receptor muscarínico M3, tales como darifenacina (Enablex, Novartis AG y zamifenacina (Pfizer); fitoterapias y terapias naturales que incluyen, pero sin limitación, acidophilus, té de camomila, aceite de onagra, semillas de hinojo, ajeno, consuelda y compuestos de Bao-Ji-Wan (magnolol, honokiol, imperatorina e isoimperatorina), como en el documento US6923992, y composiciones que comprenden lisina y un agente antiestrés para el tratamiento del síndrome del colon irritable, como se describe en el documento EPO 1550443.

#### *Insulina y agentes moduladores de insulina*

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en terapia de combinación con insulina y compuestos relacionados que incluyen insulina de primate, roedor o conejo, incluyendo variantes biológicamente activas de la misma, que incluyen variantes alélicas, más preferentemente la insulina humana disponible en forma recombinante. Las fuentes de insulina humana incluyen formulaciones farmacéuticamente aceptables y estériles, tales como las disponibles de Eli Lilly (Indianapolis, Ind. 46285) como Humulin™ (insulina humana de origen de ADNr). Véase, THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 55ª Ed (2001) Medical Economics, Thomson Healthcare (que divulga otras insulinas humanas adecuadas).

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento también pueden utilizarse en terapia de combinación con agentes que pueden reforzar los efectos o niveles de la insulina de un individuo tras la administración, por ejemplo glipizida y/o rosiglitazona. Los polipéptidos y agonistas descritos en el presente documento pueden utilizarse en terapia de combinación con SYMLIN® (acetato de pramlintida) y Exenatide® (exendina 4 sintética, un polipéptido de 39 aa).

#### *Agentes para el tratamiento del íleo posoperatorio*

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento también pueden utilizarse en terapia de combinación con agentes (por ejemplo, Entereg™ (alvimopan; anteriormente llamado ado lor/ADL 8-2698), conivaptan y agentes relacionados descritos en el documento US 6.645.959) utilizados para el tratamiento del íleo posoperatorio y otros trastornos.

*Agentes antihipertensores*

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en terapia de combinación con un agente antihipertensor que incluye, pero sin limitación: (1) diuréticos, tales como tiazidas, que incluyen clortalidona, clortiazida, diclorofenamida, hidroflumetiazida, indapamida, politiazida e hidroclorotiazida; diuréticos del asa, tales como bumetanida, ácido etacrínico, furosemida y torsemida; agentes moderadores del potasio, tales como amilorida y triamterene; inhibidores de la anhidrasa carbónica, osmóticos (tales como glicerina) y antagonistas de la aldosterona, tales como espironolactona, epirenón y similares; (2) bloqueantes beta adrenérgicos tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, esmolol, indenolol, metoprolol, nadolol, nebivolol, penbutolol, pindolol, propranolol, sotalol, tertatolol, tilisolol y timolol, y similares; (3) bloqueantes del canal de calcio tales como amlodipina, aranidipina, azelnidipina, bamidipina, benidipina, bepridil, cinaldipina, clevidipina, diltiazem, efonidipina, felodipina, gallopamil, isradipina, lacidipina, lemidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nilvadipina, nirnodepina, nisoldipina, nitrendipina, manidipina, pranidipina y verapamil, y similares; (4) inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) tales como benazepril; captopril; ceranapril; cilazapril; delapril; enalapril; enalapril; fosinopril; imidapril; lisinopril; losinopril; moexipril; quinapril; quinaprilat; ramipril; perindopril; perindopril; quanipril; espirapril; tenocapril; trandolapril y zofenopril, y similares; (5) inhibidores de la endopeptidasa neutra tales como omapatrilat, cadoxatril y ecadotril, fosidotril, sampatrilat, AVE7688, ER4030 y similares; (6) antagonistas de la endotelina tales como tezosentán, A308165 y YM62899, y similares; (7) vasodilatadores tales como hidralazina, clonidina, minoxidil y alcohol nicotínico, y similares; (8) antagonistas del receptor de la angiotensina II tales como aprosartán, candesartán, eprosartán, irbesartán, losartán, olmesartán, prazosartán, tasosartán, telmisartán, valsartán y EXP-3137, FI6828K y RNH6270, y similares; (9) bloqueantes  $\alpha/\beta$  adrenérgicos tales como nipradilol, arotinolol y amosulalol, y similares; (10) bloqueantes alfa 1, tales como terazosina, urapidil, prazosina, tamsulosina, bunazosina, trimazosina, doxazosina, naftopidil, indoramina, WHP 164 y XENOIO, y similares; (11) agonistas alfa 2 tales como lofedidina, tiamenidina, moxonidina, rilmenidina y guanobenz, y similares; (12) inhibidores de la aldosterona y similares, y (13) agentes de unión a la angiopoyetina 2, tales como los divulgados en el documento WO03/030833. Los agentes antihipertensores específicos que pueden utilizarse en combinación con los polipéptidos y agonistas descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación: diuréticos tales como tiazidas (por ejemplo, clortalidona, clortiazida (CAS RN 2259-96-3), clortiazida (CAS RN 72956-09-3, que puede prepararse como se divulga en el documento US2809194), diclorofenamida, hidroflumetiazida, indapamida, politiazida, bendoflumetazida, meticlozazide, politiazida, triclormetazida, clortalidona, indapamida, metolazona, quinetazona, altiazida (CAS RN 5588-16-9, que puede prepararse como se divulga en la Patente Británica n.º 902.658), benztiiazida (CAS RN 91-33-8, que puede prepararse como se divulga en el documento US3108097), butiazida (que puede prepararse como se divulga en la Patente Británica n.º 861.367) e hidroclorotiazida), diuréticos del asa (por ejemplo bumetanida, ácido etacrínico, furosemida y torasemida), agentes moderadores de potasio (por ejemplo amilorida y triamterene (número CAS 396-01-0)), y antagonistas de la aldosterona (por ejemplo espironolactona (número CAS 52-01-7), epirenona y similares); bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos tales como Amiodarona (Cordarona, Pacerona), clorhidrato de bunolol, (CAS RN 31969-05-8, Parke-Davis), acebutolol ( $\pm$ N-[3-acetil-4-[2-hidroxi-3-[1 metiletil]amino]propoxi]fenil]butanamida, o ( $\pm$ )-3'-acetil-4'-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]butiranilida), clorhidrato de acebutolol (por ejemplo, Sectral®, Wyeth-Ayerst), clorhidrato de alprenolol (CAS RN 13707-88-5, véase la Solicitud de Patente de los Países Bajos n.º 6.605.692), atenolol (por ejemplo Tenormin®, AstraZeneca), clorhidrato de carteolol (por ejemplo, Cartrol® Filmtab®, Abbott), clorhidrato de Celiprolol (CAS RN 57470-78-7, véase también en el documento US4034009), clorhidrato de cetamolol (CAS RN 77590-95-5, véase también US4059622), clorhidrato de labeltalol (por ejemplo, Normodyne®, Schering), clorhidrato de esmolol (por ejemplo, Brevibloc®, Baxter), clorhidrato de levobetaxolol (por ejemplo Suspensión Oftalmológica Betaxon™, Alcon), clorhidrato de levobunolol (por ejemplo, Betagan® Liquifilm®, con C CAP® Compliance Cap, Allergan), nadolol (por ejemplo Nadolol, Mylan), practolol (CAS RN 6673-35-4, véase también el documento US3408387), corhidrato de propranolol (CAS RN 318-98-9), clorhidrato de sotalol (por ejemplo Betapace AF™, Berlex), timolol (2-Propanol, 1-[(1,1-dimetiletil)amino]-3-[[4-(4-morfolinil)-1,2,5-tiadiazol-3-il]oxi]-, hemihidrato, (S)-, CAS RN 91524-16-2), maleato de timolol (S)-I-[(1,1-dimetiletil)amino]-3-[[4-(4-morfolinil)-1,2,5-tiadiazol-3-il]oxi]-2-propanol (Z)-2-butenodioato, sal (1:1), CAS RN 26921-17-5), bisoprolol (2-Propanol, 1-[4-[[2-(1-metiletoxi)etoxi]metil]fenoxil]-3-[(1-metiletil)amino]-, ( $\pm$ ), CAS RN 66722-44-9), fumarate de bisoprolol (tal como (E)-2-butenodioato de ( $\pm$ )-1-[4-[[2-(1-Metiletoxi)etoxi]metil]fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-2-propanol (2:1) (sal), por ejemplo, Zebeta™, Lederle Consumer), nebivalol (2H-1-Benzopiran-2-metanol,  $\alpha\alpha'$ -[imino-bis(metilen)]bis[6-fluoro-3,4-dihidro-, CAS RN 99200-09-6, véase también la patente de Estados Unidos N.º 4.654.362), corhidrato de cicloprolol, como 2-Propanol, 1-[4-[2-(ciclopropilmetoxi)etoxi]fenoxi]-3-[1-metiletil)amino]-, corhidrato, A.A.S. RN 63686-79-3), corhidrato de dexpropranolol (2-Propanol, 1-[1-metiletil)amino]-3-(1-naftaleniloxi)-corhidrato (CAS RN 13071-11-9), corhidrato de diacetolol (Acetamida, N-[3-acetil-4-[2-hidroxi-3-[(1-metil-etil)amino]propoxi]fenil]-, monocorhidrato CAS RN 69796-04-9), corhidrato de dilevalol (Benzamida, 2-hidroxi-5-[1-hidroxi-2-[1-metil-3-fenilpropil]amino]etil]-, monocorhidrato, CAS RN 75659-08-4), corhidrato de exaprolol (2-Propanol, 1-(2-ciclohexilfenoxi)-3-[(1-metiletil)amino]-, corhidrato CAS RN 59333-90-3), sulfato de flestolol (ácido Benzoico, 2-fluoro-3-[[2-[aminocarbonil]amino]-dimetiletil]amino]-2-hidroxiopropil éster, (+)-sulfato (1:1) (sal), CAS RN 88844-73-9; corhidrato de metalol (Metanosulfonamida, N-[4-[1-hidroxi-2-(metilamino)propil]fenil]-, monocorhidrato CAS RN 7701-65-7), metoprolol 2-Propanol, 1-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-3-[1-metiletil)amino]-; CAS RN 37350-58-6), tartrato de metoprolol (tal como 2-Propanol, 1-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-, por ejemplo, Lopressor®, Novartis), sulfato de pamatolol (ácido carbámico, [2-[4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]pro-poxil]fenil]-etil]-, metil éster, ( $\pm$ ) sulfato (sal) (2:1), CAS RN 59954-01-7), sulfato de penbutolol (2-Propanol, 1-(2-ciclopropilfenoxi)-3-[1,1-dimetiletil)amino]1, (S)-, sulfato (2:1) (sal), CAS RN

38363-32-5), practolol (Acetamida, N-[4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]-propoxi]fenil]-, CAS RN 6673-35-4; corhidrato de tiprenolol (Propanol, 1-[(1-metiletil)amino]-3-[2-(metiltio)-fenoxi]-, corhidrato, (±), CAS RN 39832-43-4), tolamolol (Benzamida, 4-[2-[(2-hidroxi-3-(2-metilfenoxi)-propil]amino]etoxil]-, CAS RN 38103-61-6), bopindolol, indenolol, pindolol, propanolol, tertatolol y tilisolol, y similares; bloqueantes de canales de calcio tales como sal besilato de amlodipina (tal como bencenosulfonato de 3-etil-5-metil-2-(2-aminoetoximetil)-4-(2-clorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridinadicarboxilato, por ejemplo, Norvasc®, Pfizer), maleato de clentiazem (1,5-Benzotiazepin-4(5H)-ona, 3-(acetiloxi)-8-cloro-5-[2-(dimetilamino)etil]-2,3-dihidro-2-(4-metoxifenil)-(2S-cis)-, (Z)-2-butenodioato (1:1), véase también el documento US4567195), isradipina (ácido 3,5-Piridinedicarboxílico, 4-(4-benzofurazanil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-, metil 1-metiletil éster, (±)-4(4-benzofurazanil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridinadicarboxilato, véase también el documento US4466972); nimodipina (tal como isopropil (2-metoxietil) 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5-piridina-dicarboxilato, por ejemplo Nimotop®, Bayer), felodipina (tal como etil metil 4-(2,3-diclorofenil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridinadicarboxilato-, por ejemplo Plendil® Extended-Release, AstraZeneca LP), nilvadipina ácido 3,5-Piridinedicarboxílico, 2-ciano-1,4-dihidro-6-metil-4-(3-nitrofenil)-,3-metil 5-(1-metiletil) éster, véase también el documento US3799934), nifedipina (tal como ácido 3,5-piridinadicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, dimetiléster, por ejemplo, Procardia XL® comprimidos de liberación prolongada, Pfizer), clorhidrato de diltiazem (tal como 1,5-Benzotiazepin-4(5H)-ona,3-(acetiloxi)-5[2-(dimetilamino)etil]-2-,3-dihidro-2(4-metoxifenil)-, monoclorhidrato, (±)-cis-, por ejemplo, Tiazac®, Forest), clorhidrato de verapamil (tal como benceno-acetronitrilo, clorhidrato de (alfa)-[[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi-(alfa)-(1-metiltetil)], por ejemplo, Isoptin® SR, Knoll Labs), clorhidrato de teludipina (ácido 3,5-Piridinedicarboxílico, 2-[(dimetilamino)etil]4-[2-[(1E)-3-(1,1-dimetiletoxi)-3-oxo-1-propenil]fenil]-1,4-dihidro-6-metil-, dietiléster, monoclorhidrato CAS RN 108700-03-4), belfosdil (ácido fosfónico, [2-(2-fenoxi etil)-1,3-propano-diil]bis-, tetrabutyl éster CAS RN 103486-79-9), fostedil (ácido fosfónico, [[4-(2-benzotiazolil)fenil]metil]-, dietil éster CAS RN 75889-62-2), aranidipina, azelnidipina, barnidipina, benidipina, bepridilo, cinaldipina, clevidipina, efonidipina, gallopamilo, lacidipina, lemidipina, lercanidipina, maleato de monatepilo (1-Piperazinabutanamida, N-(6,11-dihidrodibenzo(b,e)tiepin-11-il)<sub>4</sub>-(4-fluorofenil)-, (+)-, (Z)-2-butenodioato (1:1) maleato de (±)-N-(6,11-Dihidrodibenzo(b,e)tiep-in-11-il)-4-(p-fluorofenil)-1-piperazinabutiramida (1:1) CAS RN 132046-06-1), nicardipina, nisoldipina, nitrendipina, manidipina, pranidipina y similares; antagonistas del canal de calcio T, tales como mibefradil; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), tales como benazepril, clorhidrato de benazepril (tales como ácido 3-[[1-(etoxicarbonil)-3-fenil-(1S)-propil]amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1H-1-(3S)-benzazepina-1-acético monoclorhidrato, por ejemplo, Lotrel®, Novartis), captopril (tal como 1-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina, por ejemplo, Captopril, Mylan, CAS RN 62571-86-2 y otros divulgados en el documento US4046889), ceranapril (y otros divulgados en el documento US4452790), cetapril (alacepril, Dainippon, divulgado en Eur. Therap. Res. 39: 671 (1986); 40:543 (1986)), cilazapril (Hoffman-LaRoche) divulgado en J. Cardiovasc. Pharmacol. 9: 39 (1987), indalapril (clorhidrato de delapril (2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida, 3-biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il-6-cloro-3,4-dihidro-, 1,1-dióxido CAS RN 2259-96-3); divulgado en el documento US4385051), enalapril (y otros divulgados en el documento US4374829), enalapril, enalaprilat, fosinopril, ((tal como L-prolina, 4-ciclohexil-1-[[[2-metil-1-(1-oxopropoxi)propoxi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-, sal de sodio, por ejemplo, Monopril, Bristol-Myers Squibb, y otros divulgados en el documento US4168267), fosinopril de sodio (L-prolina, 4-ciclohexil-1-[[[2-metil-1-(1-oxopropoxi)propoxi], imidapril, indolapril (Schcring, divulgado en J. Cardiovasc. Pharmacol. 5:643, 655 (1983)), lisinopril (Merck), losinopril, moexipril, clorhidrato de moexipril (ácido 3-isoquinolinacarboxílico, 2-[(2S)-2-[[[1-(1S)-1-(etoxicarbonil)-3-fenilpropil]amino]-1-oxopropil]-1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-, monoclorhidrato, (3S)-CAS RN 82586-52-5), quinapril, quinaprilat, ramipril (Hoechst), divulgado en el documento EP 79022 y en Curr. Ther. Res. 40:74 (1986), perindopril erbumina (tal como ácido 2S,3aS,7aS-1-[(S)-N-[(S)-1-carboxibutil]alanil]hexahidro<sup>h</sup>-indolinacarboxílico, 1-etil éster, compuesto con terc-butilamina (1:1), por ejemplo, Aceon®, Solvay), perindopril (Servier, divulgado en Eur. J. clin. Pharmacol. 31:519 (1987)), quanipril (divulgado en el documento US4344949), espirapril (Schering, divulgado en Acta. Pharmacol. Toxicol. 59 (Sup. 5): 173 (1986)), tenocapril, trandolapril, zofenopril (y otros divulgados en el documento US4316906), rentiapril (fentiapril, divulgado en Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 10:131 (1983)), pivopril, YS980, teprotida (potenciador de la bradicinina BPP9a CAS RN 35115-60-7), BRL 36.378 (Smith Kline Beecham, véanse los documentos EP80822 y EP60668), MC-838 (Chugai, véase CA. 102:72588v y Jap. J. Pharmacol. 40:373 (1986), CGS 14824 (Ciba-Geigy, ácido 3-[[1-(1S)-1-(etoxicarbonil)-3-fenil-(1S)-propil]amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1-(3S)-benzazepina-1 acético HCl, véase la Patente del R.U. n.º 2103614), CGS 16.617 (Ciba-Geigy, ácido 3(S)-[[[1-(1S)-5-amino-1-carboxipentil]amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1H-1-benzazepina-1-etanoico, véase el documento US4473575), Ru 44570 (Hoechst, véase Arzneimittelforschung 34:1254 (1985)), R 31-2201 (Hoffman-LaRoche, véase FEBS Lett. 165:201 (1984)), C1925 (Pharmacologist 26:243, 266 (1984)), WY-44221 Wyeth, véase J. Med. Chem. 26:394 (1983)), y los divulgados en los documentos US2003006922 (párrafo 28), US4337201, US4432971 (fosfonamidas); inhibidores de la endopeptidasa neutra, tales como omapatrilat (Vanlev®), CGS 30440, cadoxatril y ecadotril, fasidotril (también conocido como aladotril y alatriopril), sampatrilat, mixanpril y gemopatrilat, AVE7688, ER4030, y los divulgados en los documentos US5362727, US5366973, US5225401, US4722810, US5223516, US4749688, US5552397, US5504080, US5612359, US5525723, EP0599444, EP0481522, EP0599444, EP0595610, EP0534363, EP534396, EP534492, EP0629627; antagonistas de la endotelina tales como tezostán, A308165 e YM62899, y similares; vasodilatadores tales como hidralazina (apresolina), clonidina (clorhidrato de clonidina (1H-imidazol-2-amina, N-(2,6-diclorofenil)4,5-dihidro-, monoclorhidrato CAS RN 4205-91-8), cataprés, minoxidil (loniten), alcohol nicotínico (roniacol), clorhidrato de diltiazem (tal como 1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona, 3-(acetiloxi)-5[2-(dimetilamino)etil]-2-,3-dihidro-2(4-metoxifenil)-, monoclorhidrato, (+)-cis-, por ejemplo, Tiazac®, Forest), dinitrato de isosorburo (tal como 2,5-dinitrato de 1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol, por ejemplo Isordil® Titradose®, Wyeth-Ayerst), mononitrato de sosorburo (tal como 1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol-1,5-nitrato, un nitrato orgánico, por ejemplo Ismo®, Wyeth-Ayerst),

nitroglicerina (tal como trinitrato de 2,3 propanotriol, por ejemplo Nitrostat® Parke-Davis), clorhidrato de verapamil (tal como bencenoacetoniol, clorhidrato de (±)-(alfa)[3-[[2-(3,4 dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi-(alfa)-(1-metiletil), por ejemplo, Covera HS® liberación prolongada, Searle), cromonar (el cual puede prepararse como se divulga en el documento USA3282938), clonitato (Annalen 1870 155), droprenilamina (que puede prepararse como se divulga en el documento DE2521113), lidoflazina (que puede prepararse como se divulga en el documento US3267104); prenilamina (que puede prepararse como se divulga en el documento US3152173), nitrato de propatilo (que puede prepararse como se divulga en la Patente Francesa n.º 1.103.113), clorhidrato de mioflazina (1-Piperazina-acetamida, 3-(aminocarbonil)<sub>4</sub>-[4,4-bis(4-fluorofenil)butil]-N-(2,6-diclorofenil)-, diclorhidrato CAS RN 83898-67-3), mixidina (Benzenetanamina, 3,4-dimetoxi-N-(1-metil-2-pirrolidinilideno)-pirrolidina, 2-[(3,4-dimetoxifenetil)imino]-1-metil-1-Metil-2-[(3, 4-dimetoxifenetil)imino]pirrolidina CAS RN 27737-38-8), molsidomina (1,2,3-Oxadiazolio, 5-[(etoxicarbonil)amino]-3-(4-morfolinil)-, salt interna CAS RN 25717-80-0), mononitrato de isosorburo (D-Glucitol, 1,4:3,6-dianhidro-, 5-nitrato CAS RN 16051-77-7), tetranitrato de eritrilo (1,2,3,4-Butanotetrol, tetranitrato, (2R,3S)-rel-CAS RN 7297-25-8), clonitrato(1,2-Propanodiol, 3-cloro-, dinitrato (7Cl, 8Cl, 9Cl) CAS RN 2612-33-1), dipiridamol etanol, 2,2',2'',-[(4,8-di-1-piperidinilpirimido[5,4-d]pirimidina-2,6-diil)dinitrilo]tetraquis-CAS RN 58-32-2), nicorandil (CAS RN 65141-46-0 3-), piridinacarboxamida (ácido N-[2-(nitrooxi)etil]-Nisoldipine, 3,5-Piridinadicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, metil 2-metilpropil éster CAS RN 63675-72-9), ácido nifedipina, 3,5-Piridinedicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, dimetil éster CAS RN 21829-25-4), maleato de perhexilina (Piperidina, 2-(2,2-diciclohexiletal)-, (2Z)-2-butenodioato (1:1) CAS RN 6724-53-4), clorhidrato de oxprenolol (2-Propanol, 1-[(1-metiletil)amino]-3-[[2-(2-propenilo)fenoxi]-, clorhidrato CAS RN 6452-73-9), pentrinitrol(1,3-Propanodiol, 2,2-bis[(nitrooxi)metil]-, mononitrato (éster) CAS RN 1607-17-6), verapamil (Bencenoacetoniol, α-3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-metilamino]propil]-3,4-dimetoxi-α-(1-metiletil)-CAS RN 52-53-9) y similares; antagonistas del receptor de la angiotensina II, tales como aprosartán, zolasartán, olmesartán, prazosartán, Fl6828K, RNH6270, candesartán (ácido 1H-Bencimidazol-7-carboxílico, 2-etoxi-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]4-il]metil]-CAS RN 139481-59-7), candesartán cilexetil (carboxilato de (+/-)-1-(ciclohexilcarbonilo)etil-2-etoxi-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]-1H-benzimidazol, CAS RN 145040-37-5, documentos US5703110 y US5196444), eprosartán (ácido 3-[1-4-carboxifenilmetil]-2-n-butyl-imidaxol-5-il]-[2-tienilmetil] propenoico, documentos US5185351 y US5650650), irbesartán (2-n-butyl-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil] 1,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-4-ona, documentos US5270317 y US5352788), losartán (2-N-butyl-4-cloro-5-hidroximetil-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]imidazol, sal de potasio, documentos USA5138069, US5153197 y US5128355), tasosartán (5,8-dihidro-2,4-dimetil-8-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]4-il]metil]-pirido[5,6-d]pirimidin-7(6H)-ona, documento US5149699), telmisartán ácido 4'-[(1,4-dimetil-2'-propil-(2,6'-bi-1H-benzimidazol)-r-il)]-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico, CAS RN 144701-48-4, documento US5591762), milfasartán, abitesartán valsartán (Diovan® (Novartis), (S)-N-valeril-N-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]valina, documento US5399578), EXP-3137 (ácido 2-N-butyl-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]imidazol-5-carboxílico, documentos US5138069, US5153197 y US5128355), 3-(2'-(tetrazol-5-il)-1,1'-bifenil-4-il)metil-5,7-dimetil-2-etil-3H-imidazo[4,5-b]piridina, ácido 4'[[2-metil-4-metil-6-(5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridin-2-il)-benzimidazol-1-il]metil]-1,1'-bifenil]-2-carboxílico, 2-butyl-6-(1-metoxi-1-metiletil)-2-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil] guinazolin-4(3H)-ona, ácido 3-[[2'-carboxibifenil-4-il]metil] -2-ciclopropil-7-metil-3H-imidazo[4,5-b]piridina, 2-butyl-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]imidazol-carboxílico, ácido 2-butyl-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-carboxílico-1-(etoxicarbonil-oxi)etil éster sal de potasio, disal de dipotasio, 2-butyl-4-(metiltio)-1-[[2-[[[(propilamino)carbonil]amino]-sulfonil](1,1'-bifenil)-4-il]metil]-1H-imidazol-5-carboxilato, metil-2-[[4-butyl-2-metil-6-oxo-5-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1-(6H)-pirimidinil]metil]-3-tiofencarboxilato, 5-[[3,5-dibutyl-1H-1,2,4-triazol-4(3H)metil]-2-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)fenil]]piridina, 6-butyl-2-(2-feniletil)-5[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]pirimidin-4(3H)-ona sal de D,L lisina, 5-metil-7-n-propil-8-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-[1,2,4]-triazolo[1,5-c]pirimidin-2(3H)-ona, 2,7-dietil-5-[[2'-(5-tetrazolo)bifenil-4-il]metil]-5H-pirazolo[1,5-b][1,2,4]triazol sal de potasio, ácido 2-[[2-butyl-4,5-dihidro-4-oxo-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)-4-bifenilmetil]-3H-imidazo[4,5-c]piridina-5-il]metil]benzoico, etil éster, sal de potasio, 3-metoxi-2,6-dimetil-4-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)-1,1'-bifenil-4-il]metil]piridina, ácido 2-etoxi-1-[[2'-(5-oxo-2,5-di-hidro-1,2,4-oxadiazol-3-il)bifenil-4-il]metil]-1H-benzimidazol-7-carboxílico, ácido 1-[N-(2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il-metil)-N-valeroilaminometil]ciclopentano-1-carboxílico, 7-metil-2n-propil-3-[[2'1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-3H-imidazo[4,5-6]piridina, 2-[5-[[2-etil-5,7-dimetil-3H-imidazo[4,5-b]piridina-3-il]metil]-2-quinolinil] benzoato de sodio, 2-butyl-6-cloro-4-bidroximidil-5-metil-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]piridina, ácido 2-[[[2-butyl-1-[(4-carboxifenil)metil]-1H-imidazol-5-il]metil]amino]benzoico tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]pirimidin-6-ona, 4(S)-[4-(carboximetil)fenoxi]-N-[2(R)-[4-(2-sulfobenzamido)imidazol-1-il]octanil]-L-prolina, 1-(2,6-dimetilfenil)-4-butyl-1,3-dihidro-3-[[6-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)fenil]-3-piridinil]metil]-2H-imidazol-2-ona, 5,8-etano-5,8-dimetil-2-n-propil-5,6,7,8-tetrahidro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-1H,4H-1,3,4a,8a-tetrazaciclopentanaftaleno-9-ona, 4-[1-[[2'-(1,2,3,4-tetrazol-5-il)bifen-4-il]metilamino]-5,6,7,8-tetrahidro-2-trifilquinazolina, ácido 2-(2-clorobenzoil)imino-5-etil-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-1,3,4-tiazolina, 2-[5-etil-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)hifenil-4-il]metil]-1,3,4-tiazolina-2-ilideno]aminocarbonil-1-ciclopentenocarboxilico sal de sodio, y ácido 2-butyl-4-[N-metil-N-(3-metilcrotonoil)amino]-1[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-1H-imidazole-5-carboxilico 1-etoxicarboniloxietil éster, los divulgados en las publicaciones de patente EP475206, EP497150, EP539086, EP539713, EP535463, EP535465, EP542059, EP497121, EP535420, EP407342, EP415886, EP424317, EP435827, EP433983, EP475898, EP490820, P528762, EP324377, EP323841, P420237, EP500297, EP426021, EP480204, EP429257, EP430709, EP434249, EP446062, EP505954, EP524217, EP514197, EP514198, EP514193, EP514192, EP450566, EP468372, EP485929, EP503162, EP533058, EP467207 EP399731, EP399732, EP412848, EP453210, EP456442, EP470794, EP470795, EP495626, EP495627, EP499414, EP499416, EP499415, EP511791, EP516392, EP520723, EP520724, EP539066, EP438869, EP505893, EP530702, EP400835, EP400974, EP401030, EP407102, EP411766, EP409332, EP412594, EP419048, EP480659,

EP481614, EP490587, EP467715, EP479479, EP502725, EP503838, EP505098, EP505111 EP513,979 EP507594, EP510812, EP511767, EP512675, EP512676, EP512870, EP517357, EP537937, EP534706, EP527534, EP540356, EP461040, EP540039, EP465368, EP498723, EP498722, EP498721, EP515265, EP503785, EP501892, EP519831, EP532410, EP498361, EP432737, EP504888, EP508393, EP508445, EP403159, 5 EP403158, EP425211, EP427463, EP437103, EP481448, EP488532, EP501269, EP500409, EP540400, EP005528, EP028834, EP028833, EP411507, EP425921, EP430300, EP434038, EP442473, EP443568, EP445811, EP459136, EP483683, EP518033, EP520423, EP531876, EP531874, EP392317, EP468470, EP470543, EP502314, EP529253, EP543263, EP540209, EP449699, EP465323, EP521768, EP415594, WO92/14468, WO93/08171, WO93/08169, WO91/00277, WO91/00281, WO91/14367, WO92/00067, WO92/00977, 10 WO92/20342, WO93/04045, WO93/04046, WO91/15206, WO92/14714, WO92/09600, WO92/16552, WO93/05025, WO93/03018, WO91/07404, WO92/02508, WO92/13853, WO91/19697, WO91/11909, WO91/12001, WO91/11999, WO91/15209, WO91/15479, WO92/20687, WO92/20662, WO92/20661, WO93/01177, WO91/14679, WO91/13063, WO92/13564, WO91/17148, WO91/18888, WO91/19715, WO92/02257, WO92/04335, WO92/05161, WO92/07852, WO92/15577, WO93/03033, WO91/16313, WO92/00068, WO92/02510, WO92/09278, WO92/10179, WO92/10180, 15 WO92/10186, WO92/10181, WO92/10097, WO92/10183, WO92/10182, WO92/10187, WO92/10184, WO92/10188, WO92/10180, WO92/10185, WO92/20651, WO93/03722, WO93/06828, WO93/03040, WO92/19211, WO92/22533, WO92/06081, WO92/05784, WO93/00341, WO92/04343, WO92/04059, US5104877, US5187168, US5149699, US5185340, US4880804, US5138069, US4916129, US5153197, US5173494, US5137906, US5155126, US5140037, US5137902, US5157026, US5053329, US5132216, US5057522, US5066586, US5089626, 20 US5049565, US5087702, US5124335, US5102880, US5128327, USA5151435, USA5202322, US5187159, US5198438, US5182288, US5036048, US5140036, US5087634, US5196537, US5153347, US5191086, US5190942, US5177097, US5212177, US5208234, US5208235, US5212195, US5130439, US5045540, US5041152 y US5210204, y las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; bloqueantes  $\alpha/\beta$  adrenérgicos tales como nipradilol, arotinolol, amosulalol, tosilato de bretilio (CAS RN: 61-75-6), mesilato de 25 dihidroergtamina (tal como ergotamán-3',6'-18-triona,9,10-dihidro-12'-hidroxi-2'-metil-5'-(fenilmetil)-, (5'( $\alpha$ ))-monometanosulfonato, por ejemplo, DHE 45® Inyección, Novartis), carvedilol (tal como ( $\pm$ )-1-(carbazol-4-iloxi)-3-[[2-(o-metoxifenoxi)etil]amino]-2-propanol, por ejemplo, Coreg®, SmithKline Beecham), labetalol (tal como monoclóhidrato de 5-[1-hidroxi-2-[(1-metil-3-fenilpropil)amino]etil]salicilamida, por ejemplo, Normodyne®, Schering), tosilato de bretilio (bencenometanaminio, 2-bromo-N-etil-N,N-dimetil-, sal con ácido 4-metilbencenosulfónico (1:1) 30 CAS RN 61-75-6), mesilato de fentolamina (fenol, 3-[[[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil](4-metilfenil)amino]-monometanosulfonato (sal) CAS RN 65-28-1), tartrato de solipertina (5H-1,3-dioxolo[4,5-f]indol, 7-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-, (2R, 3R)-2,3-dihidroxi-butanodioato (1:1) CAS RN 5591-43-5), clorhidrato de zolertina (piperazina, 1-fenil 4-[2-(1H-tetrazol-5-il)etil]-, monoclóhidrato (8Cl, 9Cl) CAS RN 7241-94-3) y similares; bloqueantes de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos, tales como alfuzosina (CAS RN: 81403-68-1), terazosina, urapidil, 35 prazosina (Minipress®), tamsulosina, bunazosina, trimazosina, daxarosina, naftopidil, indoramina, WHP 164, XENOIO, clorhidrato de fenspirida (que puede prepararse como se divulga en el documento US3399192), proroxán (CAS RN 33743-96-3) y clorhidrato de labetalol, y combinaciones de los mismos; agonistas  $\alpha 2$  tales como metildopa, metildopa HCL, lofexidina, tiamenidina, moxonidina, rilmenidina, guanobenz y similares; inhibidores de la aldosterona y similares; inhibidores de la renina que incluyen Aliskiren (SPPIOO; Novartis/Speedel); agentes de 40 unión a la angiopoyetina 2, tales como los divulgados en el documento WO03/030833; agentes anti angina tales como ranolazina (clorhidrato de 1-piperazinacetamida, N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxi-fenoxi)propil]-, diclorhidrato CAS RN 95635-56-6), clorhidrato de betaxolol (2-propanol, 1-[4-[2(ciclopropilmetiloxi)etil]fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-, clorhidrato CAS RN 63659-19-8), clorhidrato de butoprozina, (metanona, [4-[3(dibutilamino)propoxi]fenil](2-etil-3-indolizil)-, monoclóhidrato CAS RN 62134-34-3), cinepazet maleatel-ácido 45 piperazinacético, 4-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-, etil éster, (2Z)-2-butenodioato (1:1) CAS RN 50679-07-7), tosifeno (bencenosulfonamida, 4-metil-N-[[[(1S)-1-metil-2-feniletil]amino]carbonil]-CAS RN 32295-184), verapamilclorhidrato (bencenoacetónitrilo,  $\alpha$ -[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi- $\alpha$ -(1-metiletil)-, monoclóhidrato CAS RN 152-114), moisdolina (1,2,3-oxadiazolio, 5-[(etoxicarbonil)amino]-3-(4-morfolinil)-, sal interna CAS RN 25717-80-0) y clorhidrato de ranolazina (1-piperazincetamida, N-(2,6-dimetilfenil)<sub>4</sub>-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propilo]-, dihidrocloruro CAS RN 95635-56-6); tosifeno (bencenosulfonamida, 4-metil-N-[[[(1S)-1-metil-2-feniletil]amino]carbonil]-CAS RN 32295-184); estimulantes adrenérgicos tales como clorhidrato de 50 guanfacina (tales como clorhidrato de N-amidino-2-(2,6-diclorofenil)acetamida, por ejemplo, Tenex® Comprimidos, disponibles de Robins); metildopahidroclorotiazida (tal como levo-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilalanina) combinada con hidroclorotiazida (tal como 1,1-dióxido de 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida, por ejemplo, la combinación como, por ejemplo, Aldoril® Comprimidos, disponibles de Merck), metildopaclorotiazida (tal como 1,1-dióxido de 6-cloro-2H-1, 2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida y metildopa, como se describe anteriormente, por ejemplo, Aldoclor®, Merck), clorhidrato de clonidina (tal como clorhidrato de 2-(2,6-diclorofenilamino)-2-imidazolina y clortalidona (tal como 2-cloro-5-(1-hidroxi-3-oxo-1-isoindolinil) bencenosulfonamida), por ejemplo Combipres®, 60 Boehringer Ingelheim), clorhidrato de clonidina (tal como clorhidrato de 2-(2,6-diclorofenilamino)-2-imidazolina, Catapres®, Boehringer Ingelheim), clonidina (1H-imidazol-2-amina, N-(2,6-diclorofenil)4,5-dihidro-CAS RN 4205-90-7), Hyzaar (Merck, una combinación de losartán e hidroclorotiazida), Co-Diovan (Novartis; una combinación de ofvalsartan e hidroclorotiazida, Lotrel (Novartis; una combinación de benazepril y amlodipina), y Caduet (Pfizer, una combinación de amlodipino y atorvastatina), y los agentes divulgados en el documento US20030069221.

*Agentes para el tratamiento de trastornos respiratorios*

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en terapia de combinación con uno o más de los siguientes agentes útiles en el tratamiento de trastornos respiratorios y otros, que incluyen, pero sin limitación:

- 5 (1) agonistas  $\beta$  que incluyen, pero sin limitación: albuterol (PRO VENTIL®, S ALBUT AMOI®, VENTOLIN®), bambuterol, bitoterol, clenbuterol, fenoterol, formoterol, isoetarina (BRNKOSOL®, BRNKOMETER®), metaproterenol (ALUPENT®, METAPREL®), pirbuterol (MAXAIR®), reproterol, rimiterol, salmeterol, terbutalina (BRETHAIRE®, BRETHINE®, BRICANYL®), adrenalina, isoproterenol (ISUPREL®), bitartrato de epinefrina (PRIMATENE®), efedrina, orciprenlina, fenoterol e isoetarina; (2) esteroides, que incluyen, pero sin limitación, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, budesonida, budesonida, butixocort, dexametasona, flunisolida, flucortina, fluticasona, hidrocortisona, metil prednisona, mometasona, prednisolona, prednisona, tipredane, toxicortal, triamcinolona y triameinolona acetona; (3) combinaciones de agonistas  $\beta$ 2-corticosteroides [por ejemplo, salmeterol-fluticasona (AD V AIR®), formeterol-budesonida (S YMBICORT®)]; (4) antagonistas del receptor de leucotrienos D4/antagonistas de leucotrienos/antagonistas de LTD4 (es decir, cualquier compuesto que tenga la capacidad de bloquear, inhibir, reducir o interrumpir de otra forma la interacción entre los leucotrienos y el receptor Cys LTI) que incluyen, pero sin limitación: zafliukast, montclukast, montelukast de sodio (SINGULAIR®), pranlukast, iralukast, pobilukast, SKB-106.203 y los compuestos descritos que tengan actividad antagonizante de LTD4 descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 5.565.473; (5) inhibidores de la 5-lipooxigenasa y/o inhibidores de la biosíntesis de leucotrienos [por ejemplo, zileutón y BAY1005 (registro CA 128253-31-6)]; (6) antagonistas del receptor de la histamina H1/antihistamínicos (por ejemplo, cualquier compuesto que tenga la capacidad de bloquear, inhibir, reducir o interrumpir de otra forma la interacción entre la histamina y su receptor) que incluye, pero sin limitación: astemizol, acrivastina, antazolina, azatadina, azelastina, astemizol, bromofeniramina, maleato de bromofeniramina, carbinoxamina, carebastina, cetirizina, clorfeniramina, maleato de clorfeniramina, cimetidina clemastina, ciclizina, ciproheptadina, descarboetoxiloratadina, dexclorfeniramina, dimetindén, difenhidramina, difenilpiralina, succinato de doxilamina, doxilamina, ebastina, efletirizina, epinastina, famotidina, fexofenadina, hidroxizina, hidroxizina, cetotifeno, levocabastina, levocetirizina, levocetirizina, loratadina, meclizina, mepiramina, mequitazina, metdilazina, mianserin, mizolastina, noberastina, norasternizol, noraztemizol, fenindamina, feniramina, picurnast, prometazina, pinlamina, pirilamina, ranitidina, temelastina, terfenadina, trimeprazina, tripelenamina y triprolidina; (7) un anticolinérgico que incluye, pero sin limitación: atropina, benzotropina, biperidén, flutropio, hiosciamina (por ejemplo Levsin®, Levbid®, Levsin/SL®, Anaspaz®, Levsinex timecaps®, NuLev®), ilutropio, ipratropio, bromuro de ipratropio, metscopolamina, oxibutinina, rispenzepina, escopolamina y tiotropio; (8) un antitusivo que incluye, pero sin limitación: dextrometorfán, codeína e hidromorfona; (9) un descongestivo que incluye, pero sin limitación: pseudoefedrina y fenilpropanolamina; (10) un expectorante que incluye, pero sin limitación: guaifenesina, guaicol sulfato, terpina, cloruro de amonio, guaicolato de glicerol y glicerol yodado; (11) un broncodilatador que incluye, pero sin limitación: teofilina y aminofilina; (12) un antiinflamatorio que incluye, pero sin limitación: flurbiprofeno, diclofenaco, indometacina, cetoprofeno, S-cetoprofeno, tenoxicam; (13) un inhibidor de la PDE (fosfodiesterasa) que incluye, pero sin limitación, los divulgados en el presente documento; (14) un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante [por ejemplo xolair (también llamado omalizumab), rhuMab y talizumab]; (15) un tensioactivo de pulmón humanizado que incluye formas recombinantes de las proteínas tensioactivas SP-B, SP-C o SP-D [por ejemplo SURTAXIN®, anteriormente conocido como dsc-104 (Discovery Laboratories)]; (16) agentes que inhiben los canales de sodio epiteliales (CNaE), tales como amilorida y compuestos relacionados; (17) agentes antimicrobianos utilizados para tratar infecciones pulmonares tales como aciclovir, ampicilina, amoxicilina, doxiciclina, trimetoprima sulfametoxazol, anfotericina B, azitromicina, claritromicina, roxitromicina, claritromicina, cefalosporinas (cefotaxima, cefmetazol, etc.), ciprofloxacina, etambutol, gentamicina, ganciclovir, imipenem, isoniazida, itraconazol, penicilina, ribavirina, rifampina, rifabutina, amantadina, rimantidina, estreptomina, tobramicina y vancomicina; (18) agentes que activan la secreción de cloruro a través de canales de cloruro dependientes de  $Ca^{++}$  (tales como los agonistas del receptor purinérgico (P2Y(2))); (19) agentes que disminuyen la viscosidad del esputo, tales como la ADNasa 1 humana recombinante, (Pulmozyme®); (20) agentes antiinflamatorios no esteroides (acetaminofeno, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, alclofenaco, alminoprofeno, apazona, aspirina, benoxaprofeno, bezpiperilona, ácido buclórico, carprofeno, clidanaco, diclofenaco, diclofenaco, diflunisal, diflunisal, etodolaco, fenbuprenolona, fenbuteno, fenclorfenaco, ácido fenclórico, fenoprofeno, fentiazaco, feprazona, ácido flufenámico, flufenisal, flufenisal, fluprofeno, flurbiprofeno, flurbiprofeno, furofenaco, ibufenaco, ibuprofeno, indometacina, indometacina, indoprofeno, isoxepaco, isoxicam, cetoprofeno, cetoprofeno, cetorolaco, ácido meclofenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido mefenámico, miroprofeno, mofebutazona, nabumetona oxaprozina, naproxeno, naproxeno, ácido niflúmico, oxaprozina, oxpinaco, oxifenbutazona, fenacetina, fenilbutazona, fenilbutazona, piroxicam, piroxicam, pioprofeno, pranoprofeno, sudoxicam, tenoxicam, sulfasalazina, sulindaco, sulindaco, suprofeno, ácido tiaprofénico, tiopinaco, tioprofeno, ácido tolfenámico, tolmetina, tolmetina, zidometacina, zomepirac y zomepirac) y (21) productos terapéuticos antioxidantes aerosolizados tales como S-Nitrosoglutatión.

*Agentes antiobesidad*

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en terapia de combinación con un agente antiobesidad. Tales agentes adecuados incluyen, pero sin limitación: inhibidores de 11 $\beta$  HSD-I (11-beta hidroxidesteroides deshidrogenasa tipo 1), tal como BVT 3498, BVT 2733, 3-(1-adamantil)-4-etil-5-(etil)-4H-1,2,4-triazol, 3-(1-adamantil)-5-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-4-metil-4H-1,2,4-triazol, 3-adamantanil-4,5,6,7,8,9,10,11,12,3a-decahidro-1,2,4-

triazol[4,3-a][1,1]anuleno, y los compuestos divulgados en los documentos WO01/90091, WOO 1/90090, WOO 1/90092 y WO02/072084; antagonistas de 5HT, tales como los de los documentos WO03/037871, WO03/037887 y similares; moduladores de 5HT<sub>1a</sub>, tales como carbidopa, benserazida y los divulgados en los documentos US6207699, WO03/03149, y similares; agonistas de 5HT<sub>2c</sub> (receptor de serotonina 2c), tales como BV933, DPCA37215, IK264, PNU 22394, WAY161503, R-1065, SB 243213 (Glaxo Smith Kline) e YM 348, y los divulgados en los documentos US3914250, WO00/77010, WO02/36S96, WO02/48124, WO02/10169, WO01/66548, WO02/14152, WO02/51844, WO02/40456 y WO02/40457; moduladores del receptor 5HT<sub>6</sub>, tales como los de los documentos WO03/030901, WO03/035061, WO03/039547, y similares; acil-estrógenos, tales como oleoil-estrona, divulgada en del Mar-Grasa, M. *et al.*, Obesity Research, 9: 202-9 (2001) y la Solicitud de Patente Japonesa n.º JP 2000256190; compuestos bicíclicos anorécticos tales como 1426 (Aventis) y 1954 (Aventis), y los compuestos divulgados en los documentos WO00/18749, WO01/32638, WO01/62746, WO01/62747 y WO03/015769; antagonistas/agonistas inversos de CB 1 (receptor de cannabinoides 1), tales como rimonabant (Acomplia; Sanofi); SR-147778 (Sanofi), SR-147116 (Sanofi), BAY 65-2520 (Bayer) y SLV 319 (Solvay), y los divulgados en las 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; los agonistas de la CCK-A (colecistoquinina A), tales como AR-R 15849, GI 181771 (GSK), JMV-180, A-71378, A-71623 y SR146131 (Sanofi), y los descritos en el documento US5739106; FCNT (factores ciliares neurotróficos), tales como GI-181771 (Glaxo-SmithKline), SR1 46131 (Sanofi Synthelabo), butabindida, PD 170.292 y PD 149164 (Pfizer); derivados de FCNT, tales como Axokine® (Regenerón) y los divulgados en los documentos WO94/09134, WO98/22128 y WO99/43813; inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DP-IV), tales como isoleucina tiazolidida, valina pirrolidida, NVP-DPP728, LAF237, P93/01, P 3298, TSL 225 (ácido triptofil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico; divulgado 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, como se divulga en Ashworth *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 6, n.º 22, pág. 1163-1166 y 2745-2748 (1996), y los compuestos divulgados en las publicaciones de patente WO99/38501, WO99/46272, WO99/67279 (Probiodrug), WO99/67278 (Probiodrug), 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 hormona de crecimiento, tales como NN703, hexarrelina, MK-0677 (Merck), SM-130686, CP-424391 (Pfizer), LY 444.711 (Eli Lilly), L-692.429 y L-163.255, y tales como los divulgados en el documento USSN 09/662448, la solicitud provisional de Estados Unidos 60/203335, los documentos US6358951, USA2002049196, USA2002/022637, WO01/56592 y WO02/32888; los antagonistas/agonistas inversos de la H3 (histamina H3), tales como tioperamida, 3-(1H-imidazol-4-il)propil N-(4-pentenil)carbamato, clobenpropit, yodofenpropit, 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 de histamina H3 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)), N-fenilcarbamatos sustituidos (Reiderneister, S. *et al.*, Pharmazie, 55:83-6 (2000)) y derivados de proxifano (Sasse, A. *et al.*, J. Med. Chem. 43: 3335-43 (2000)) y moduladores del receptor de histamina H3, tales como los divulgados en los documentos WO02/15905, WO03/024928 y WO03/024929; derivados de leptina, tales como los divulgados en los documentos US5552524, US5552523, USA5552522, US5521283, WO96/23513, WO96/23514, WO96/23515, WO96/23516, WO96/23517, WO96/23518, WO96/23519 y WO96/23520; leptina, que incluye leptina humana recombinante (PEG-OB, Hoffman La Roche) y leptina metionilo humana recombinante (Amgen); inhibidores de lipasa, tales como tetrahidrolipstatina (orlistat/Xenical®), Triton WR1 339, RHC80267, lipstatina, teasaponina, fosfato de dietilumbeliferilo, FL-386, WAY-121898, Bay-N-3176, vallactona, esteracina, ebelactona A, ebelactona B y RHC 80267, y los divulgados en las publicaciones de patente WO01/77094, US44598089, US4452813, USUS512565, US5391571, USA5602151, US4405644, US4189438 y US4242453; moduladores del metabolismo de los lípidos, tales como el ácido maslínico, eritrodiol, ácido ursólico uvaol, ácido betulínico, betulina y similares, y los compuestos divulgados en el documento WO03/011267; agonistas de rMc4 (receptor de melanocortina 4), tales como CHIR86036 (Chiron), ME-10142, ME-10145 y HS-131 (Melacure), y los divulgados en las publicaciones PCT n.º WO99/64002, WO00/74679, WOO 1/991752, WOO 1/25192, WOO 1/52880, WOO 1/74844, WOO 1/70708, WO01/70337, WO01/91752, WO02/059095, 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 r Mc5 (receptor de melanocortina 5), tales como los divulgados en los documentos WO97/19952, WO00/15826, WO00/15790, USA20030092041; antagonistas del receptor de la hormona concentradora de melanina 1 (RHCM), tales como T-226296 (Takeda), SB 568849, SNP-7941 (Synaptic) y los divulgados en las publicaciones de patente WOO 1/21169, 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 divulgados en los documentos WO03/029210, WO03/047581, WO03/048137, WO03/051315, WO03/051833, WO03/053922, WO03/059904 y similares; agentes serotoninérgicos, tales como fenfluramina (tales como Pondimin® (bencenoetanamina, N-etil-alfa-

metil-3-(trifluorometil)-, clorohidrato), Robbins), dexfenfluramina (tal como Redux® (bencenoetanamina, N-etil-alfa-metil-3-(trifluorometil)-, clorhidato), Interneuron) y sibutramina ((Meridia®, Knoll/Reductil™), incluyendo mezclas racémicas, como isómeros ópticamente puros (+) y (-), y sales, disolventes, hidratos, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos, que incluyen sales monohidrato de clorhidrato de sibutramina de los mismos, y los compuestos divulgados en los documentos US4746680, US4806570 y US5436272, US20020006964, WOO 1/27068 y WOO 1/62341; 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 divulgados en los documentos US6001836, WO96/14307, WO01/23387, WO99/51600, WO01/85690, WO01/85098, WO01/85173 y 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 divulgados en las publicaciones de patente US6140354, US6191160, US6218408, US6258837, US6313298, US6326375, US6329395, US6335345, US6337332, US6329395, US6340683, EP01010691, EP-01044970, WO97/19682, WO97/20820, WO97/20821, WO97/20822, WO97/20823, WO98/27063, WO00/107409, WO00/185714, WO00/185730, WO00/64880, WO00/68197, WO00/69849, WO/0113917, WO01/09120, WO01/14376, WO01/85714, WO01/85730, WO01/07409, WO01/02379, WO01/23388, WO01/23389, WOO 1/44201, 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 nalmefene (REVEX ®), 3-metoxinaltrexona, metilnaltrexona, naloxona y naltrexona (por ejemplo PT901; Pain Therapeutics, Inc.), y los divulgados en los documentos US20050004155 y WO00/21509; antagonistas de orexina, tales como SB-334867-A y los divulgados en las 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 la PDE (por ejemplo, compuestos que enlentecen la degradación de AMP cíclico (AMPC) y/o GMP cíclico (GMPc) por la inhibición de las fosfodiesterasas, lo que puede conducir a un aumento relativo de la concentración intracelular de AMPC y GMPc; los posibles inhibidores de la PDE son principalmente las sustancias que deben enumerarse entre la clase que consiste en los inhibidores de la PDE3, la clase que consiste en los inhibidores de la PDE4 y/o la clase que consiste en los inhibidores de la PDE5, en particular las sustancias que pueden denominarse como tipos mixtos de inhibidores de la PDE3/4 o como tipos mixtos de inhibidores de la PDE3/4/5), tales como las divulgadas en las 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, 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, 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, DE1 116676, DE2162096, EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345 US6331543, US20050004222 (incluyendo las divulgadas en las fórmulas 1-XIII y los párrafos 37-39, 85-0545 y 557-577), WO9307124, EP0163965, EP0393500, EP0510562, EP0553174, WO9501338 y WO9603399, así como los inhibidores de la PDE5 (tales como RX-RA-69, SCH-51866, KT-734, vesnarrinona, zaprinast, SKF-96231, ER-21355, BF/GP-385, NM-702 y sildenafil (Viagra™)), inhibidores de la PDE4 (tales como etazolato, ICI63197, RP73401, imazolidinona (RO-20-1724), MEM 1414 (R1533/R1500; Pharmacia Roche), denbufilina, rolipram, oxagrelato, nitraquazona, Y-590, DH-6471, SKF-94120, motapixona, lixazinona, indolidán, 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, TIBENELAST, SB-210667, SB-211572, SB-211600, SB-212066, SB-212179, GW-3600, CDP-840, mopidamol, anagrelida, ibudilast, amrinona, pimobendán, cilostazol, quazinona y N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxibenzamida, inhibidores de la PDE3 (tales como ICI153, 100, bemorandane (RWJ 22867), MCI-154, UD-CG 212, sulmazol, ampizona, cilostamida, carbazerán, piroximona, imazodán, CI-930, siguazodán, adibendán, saterinona, SKF-95654, SDZ-MKS-492, 349-U-85, emoradán, EMD-53998, EMD-57033, NSP-306, NSP-307, revizinona, NM-702, WIN-62582 y WIN-63291, enoximona y milrinona, inhibidores de la PDE3/4 (tales como benafentrina, trequinsina, ORG-30029, zardaverina, L-686398, SDZ-ISQ-844, ORG-20241, EMD-54622 y tolafentrina) y otros inhibidores de la PDE (tales como vinpocetina, papaverina, enprofilina, cilomilast, fenoximona, pentoxifilina, roflumilast, tadalafil (Cialis®), teofilina y vardenafil (Levitra®); antagonistas del Neuropéptido Y2 (NPY2) que incluyen, pero sin limitación: polipéptido YY y fragmentos y variantes del mismo (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 divulgados en los documentos WO02/47712, WO03/026591, WO03/057235 y WO03/027637, inhibidores de la recaptación de serotonina, tales como paroxetina, fluoxetina (Prozac™), fluvoxamina, sertralina, citalopram e imipramina, y los divulgados en los documentos US6162805, US6365633, WO03/00663, WOO 1/27060 y WOO 1/162341; agonistas

de la hormona tiroidea  $\beta$ , tales como KB-2611 (KaroBioBMS) y los divulgados en los documentos WO02/15845, WO97/21993, WO99/00353, GB98/284425, Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/183.223 y la Solicitud de Patente Japonesa n.º JP 2000256190; activadores de UCP-I (proteína de desacoplamiento 1), 2 o 3, tales como ácido fitánico, ácido 4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-1-propenil]benzoico (TTNPB), ácido retinoico y los divulgados en el documento WO99/00123; agonistas  $\beta_3$  (receptor beta adrenérgico 3), tales como AJ9677/TAK677 (Dainippon/Takeda), L750355 (Merck), C331648 (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 divulgados en los documentos US5541204, US5770615, US5491134, US5776983, US488064, US5705515, US5451677, WO94/18161, WO95/29159, WO97/46556, WO98/04526 y WO98/32753, WO01/74782, WO02/32897, WO03/014113, WO03/016276, WO03/016307, WO03/024948, WO03/024953 y WO03/037881; agentes noradrenérgicos que incluyen, pero sin limitación, 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.º 1), mazindol ((o 5-(p-clorofenil)-2,5-dihidro-3H-imidazo[2,1-a]isoindol-5-ol), tal como Sanorex®, Novartis o Mazanor®, Wyeth Ayerst), fenilpropanolamina (o bencenometanol, alfa-(1-aminoetil)-, clorhidrato), fentermina ((o fenol, 3-[[4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)etil](4-metilfenil-1)amino], monoclorhidrato), tal como Adipex-P®, Lemmon, FASTIN®, Smith-Kline Beecham y Ionamin®, Medeva), fendimetrazina ((o (2S,3S)-3,4-dimetil-2-fenilmorfolino L-(+)-tartrato (1:1)), tal como Metra® (Forest), Plegine® (Wyeth-Ayerst), Prelu-2® (Boehringer Ingelheim) y Statobex® (Lemmon), tartrato de fendamina (tal como Thephorin® (2,3,4,9-tetrahidro-2-metil-9-fenil-1H-indenol[2,1-c]piridina L-(+)-tartrato (1:1)), Hoffmann-LaRoche), metanfetamina (tal como Desoxyn®, clorhidrato de (S)-N, (alfa)-dimetilbencenoetanamina)) y tartrato de fendimetracina (tal como Bontril® Cápsulas de Liberación Retardada, Amarin (tartrato de 3,4-dimetil-2-fenilmorfolino); reguladores positivos/inductores de la oxidación de los ácidos grasos tales como Famoxin® (Genset); inhibidores de la monamina oxidasa que incluyen, pero sin limitación, befloxatona, moclobemida, brofaromina, fenoxatina, esuprona, befol, toloxatona, pirlindol, amiflamina, sercloremina, bazineprina, lazabemida, milacemida, caroxazona y otros determinados compuestos como se divulga en el documento WO01/12176, y otros agentes antiobesidad tales como los agonistas de 5HT-2, inhibidores de la ACC (acetil-CoA carboxilasa) tales como los divulgados en el documento WO03/072197, ácido alfa-lipoico (alfa-LA), AOD9604, inhibidores del apetito, tales como los del documento WO03/40107, ATL-962 (Alizyme PLC), benzocaína, clorhidrato de benzfetamina (Didrex), focu (*Fucus vesiculosus*), agonistas de BRS3 (receptor de la bombesina subtipo 3), bupropión, cafeína, agonistas de CCK, quitosano, cromo, ácido linoleico conjugado, agonistas de la hormona liberadora de corticotropina, deshidroepiandrosterona, inhibidores de la DGAT1 (diacilglicerol aciltransferasa 1), inhibidores de la DGAT2 (diacilglicerol aciltransferasa 2), inhibidores del transportador de dicarboxilato, efedra, exendina 4 (un inhibidor de glp-1), inhibidores de la FAS (ácido graso sintetasa) (tales como cerulenina y C75), inhibidores de la reabsorción de grasas (tales como los del documento WO03/053451 y similares), inhibidores del transportador de ácidos grasos, fibras solubles en agua naturales (tales como psyllium, plantago, goma guar, avena, pectina), antagonistas de la galanina, galega (Ruda Cabruna, Gallega), *Garcinia cambogia*, germandrina (*Teucrium chamaedrys*), anticuerpos de grelina y antagonistas de grelina (tales como los divulgados en los documentos WO01/87335 y WO02/08250), hormonas polipeptídicas y variantes de las mismas que afectan a la secreción de los islotes de Langerhans, tales como las hormonas de la familia génica de la secretina/polipéptido inhibidor gástrico (PIG)/polipéptido intestinal vasoactivo (PIV)/polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la hipófisis (PAACH)/polipéptido similar a glucagón II (GLP-II)/glucentina/glucagón y/o los de la familia génica del polipéptido relacionado con genes de la adrenomedulina/amilina/calcitonina (CGRP) que incluyen los agonistas de GLP-1 (polipéptido similar a glucagón I) (por ejemplo (1) exendina 4, 2) las moléculas GLP-1 descritas en el documento US20050130891 que incluyen GLP-1 (7-34), GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36) o GLP-1 (7-37) en su forma carboxilada o amidada de forma C terminal o como polipéptidos GLP-I modificados, y modificaciones de los mismos que incluyen los descritos en los párrafos 17-44 del documento US20050130891, y se emplean derivados obtenidos de GLP-1-(7-34)COOH y la correspondiente amida ácida que tienen 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. Preferentemente, R es el resto de un ácido carboxílico. Particularmente preferente son los siguientes restos de ácido carboxílico: formilo, acetilo, propionilo, isopropionilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo) y glp-1 (polipéptido similar a glucagón-1), antagonistas de glucocorticoides, inhibidores de la glucosa transportada, secretagogos de la hormona del crecimiento (tales como los divulgados y descritos de forma específica 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 rMc3 (receptor de la melanocortina 3), agonistas/antagonistas de MCH2R (hormona concentradora de melanina 2R), antagonistas de la hormona concentradora de melanina, agonistas de melanocortina (tales como Melanotán II o los descritos en el documento WO 99/64002 y WO 00/74679), hierba nomame, inhibidores del transportador de fosfato, compuesto de phytopharm 57 (CP 644.673), piruvato, inhibidores de SCD-I (estearoil-CoA desaturasa-1), T71 (Tularik, Inc., Boulder CO), Topiramato (Topimax®, indicado como un anticonvulsivo que se ha demostrado que aumenta la pérdida de peso), moduladores de factores de transcripción (tales como los divulgados en el documento WO03/026576), inhibidores de la  $\beta$ -hidroxi esteroides deshidrogenasa ( $\beta$ -HSD-I),  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato, p57 (Pfizer), Zonisamida (Zonegran™, indicado como un antiepiléptico que se ha demostrado que conduce a la pérdida de peso), y los agentes divulgados en el documento US20030119428, párrafos 20-26.

*Agentes antidiabéticos*

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en combinación terapéutica con uno o más agentes antidiabéticos, que incluyen, pero sin limitación: agonistas de PPAR $\gamma$  como las glitazonas (por ejemplo, WAY-120.744, AD 5075, balaglitazona, ciglitazona, darglitazona (CPG-86325, Pfizer), englitazona (CP-68722, Pfizer), isaglitazona (MIT/J&J), MCC-555 (Mitsubishi divulgado en el documento US5594016), pioglitazona (tal como pioglitazona Actos™; Takeda), rosiglitazona (Avandia™, Smith Kline Beecham), maleato de rosiglitazona, troglitazona (Rezulin®, divulgado en el documento US4572912), rivoglitazona (CS-O1 1, Sankyo), GL-262570 (Glaxo Wellcome), BRL49653 (divulgado en WO98/05331) CLX-0921, 5-BTZD, GW-0207, LG-100641, JJT-501 (JPNT/P&U), L-895645 (Merck), R-119702 (Sankyo/Pfizer), NN-2344 (Dr. Reddy/NN), YM-440 (Yamanouchi), LY-300512, LY-519818, R483 (Roche), T131 (Tularik) y similares, y compuestos divulgados en los documentos US4687777, US5002953, US5741803, US5965584, US6150383, US6150384, US6166042, US6166043, US6172090, US6211205, US6271243, US6288095, US6303640, US6329404, US5994554, WO97/10813, WO97/27857, WO97/28115, WO97/28137, WO97/27847, WO00/76488, WO03/000685, WO03/027112, WO03/035602, WO03/048130, WO03/055867, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; biguanidas tales como clorhidrato de metformina (clorhidrato de N,N-dimetilimidodicarbonimida diamida, tal como Glucophage™, Bristol-Myers Squibb); clorhidrato de metformina con gliburida, tal como Glucovance™ Bristol-Myers Squibb); buformina (diamina imidodicarbonimídica, N-butil-); etoformina (1-butil-2-etilbiguanida, Schering A. G.); otras formas salinas de metformina (incluyendo cuando la sal se selecciona del grupo de, acetato, benzoato, citrato, ftimarato, embonato, clorfenoxiacetato, glicolato, palmoato, aspartato, metanosulfonato, maleato, paraclorofenoxisobutirato, formato, lactato, succinato, sulfato, tartrato, ciclohexanocarboxilato, hexanoato, octanoato, decanoato, hexadecanoato, octodecanoato, bencenosulfonato, trimetoxibenzoato, paratoluenosulfonato, adamantanocarboxilato, glicoxilato, glutamato, pirrolidonocarboxilato, naftalenosulfonato, 1-glucosafosfato, nitrato, sulfito, ditionato y fosfato), y fenformina; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa-IB (PTP-IB), tales como A-401.674, KR 61639, OC-060062, OC-83839, OC-297962, MC52445, MC52453, ISIS 113715 y los divulgados en los documentos WO99/585521, WO99/58518, WO99/58522, WO99/61435, WO03/032916, WO03/032982, WO03/041729, WO03/055883, WO02/26707, WO02/26743, JP2002114768 y las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; sulfonilureas tales como acetohexamida, (por ejemplo Dymelor, Eli Lilly), carbutamida, clorpropamida (por ejemplo, Diabinese®, Pfizer), gliamilida (Pfizer), gliclazida (por ejemplo Diamcron, Servier Canadá Inc), glimepirida (por ejemplo la divulgada en el documento USA4379785, tal como Amaryl, Aventis), glipentida, glipizida (por ejemplo Glucotrol y Glucotrol XL Liberación Prolongada, Pfizer), gliquidona, glisolamida, gliburida/glibenelamida (por ejemplo, Micronasa y Glinasa Prestab, Pharmacia & Upjohn y Diabeta, Aventis), tolazamida (por ejemplo Tolinas) y tolbutamida (por ejemplo, Orinasa), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; meglitinidas tales como repaglinida (por ejemplo, Prandin®, Novo Nordisk), KAD1229 (PF/Kissei) y nateglinida (por ejemplo Starlix®, Novartis), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; inhibidores de la glucósido hidrolasa (o inhibidores glucósido) tales como acarbosa (por ejemplo, Precose™, Bayer divulgado en el documento US4904769), miglitol (tales como GLYSET™, Pharmacia & Upjohn, divulgado en el documento US4639436), camiglibosa (metil 6-desoxi-6-[(2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxi-2-(hidroximetil)piperidino]-alfa-D-glucopiranosido, Marion Merrell Dow), voglibosa (Takeda), adiposina, emiglitato, pradimicina-Q, salbostatina, CKD-711, MDL-25.637, MDL-73.945 y MOR 14, y los compuestos divulgados en los documentos US4062950, US4174439, US4254256, US4701559, US4639436, US5192772, US4634765, US5157116, US5504078, US5091418, US5217877, US51091 y WOO 1/47528 (poliaminas); inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa tales como tendamistat, trestatina y A1-3688, y los compuestos divulgados en los documentos US4451455, US4623714 y US4273765; inhibidores de SGLT2 que incluyen los divulgados en los documentos US6414126 y US6515117; un inhibidor de  $\alpha$ P2 tal como se divulga en el documento US6548529; los secretagogos de insulina tales como linoglitrida, A-4166, forskilina, AMPc dibutirilo, isobutilmetilxantina (IBMX), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; inhibidores de la oxidación de ácidos grasos, tales como clomoxir y etomoxir, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; antagonistas de A2, tales como midaglizol, isaglidol, deriglidol, idazoxán, caroxán y fluparoxán, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; insulina y compuestos relacionados (por ejemplo, miméticos de insulina) tales como biota, LP-100, novarapid, insulina detemir, insulina lispro, insulina glargina, suspensión de insulina cinc (lente y ultralente), insulina Lys-Pro, GLP-I (1-36) amida, GLP-I (73-7) (insulintropina, divulgada en el documento US5614492), LY-315902 (Lilly), GLP-I (7-36)-NH2, AL-401 (Autoimmune), determinadas composiciones como se divulgan en los documentos USA4579730, USA4849405, US4963526, US5642868, US5763396, US5824638, US5843866, US6153632, US6191105 y WO 85/05029, e insulina de primate, roedor o conejo, incluyendo variantes biológicamente activas de las mismas que incluyen variantes alélicas, más preferentemente insulina humana disponible en forma recombinante (las fuentes de insulina humana incluyen formulaciones farmacéuticamente aceptables y estériles, tales como las disponibles de Eli Lilly (Indianapolis, Ind. 46285) como Humulin™ (insulina humana de origen de ADN $r$ ), también véase THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 55ª Ed. (2001) Medical Economics, Thomson Healthcare (que divulga otras insulinas humanas adecuadas); no tiazolidinodionas tales como JT-501 y farglitazar (GW-2570/GI-262579) y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de las mismas; agonistas dobles de PPAR $\alpha/\gamma$  tales como AR-HO39242 (Astrazeneca), GW-409544 (Glaxo-Wellcome), BVT-142, CLX-0940, GW-1536, GW-1929, GW-2433, KRP-297 (Kyorin Merck), 5-[(2,4-dioxo tiazolidinil)metil]metoxi-N-[[4-(trifluorometil)fenil]metilbenzamida], L-796449, LR-90, MK-0767 (Merck/Kyorin/Banyu) SB 219994, muraglitazar (BMS), lesaglitazar (Astrazeneca), reglitazar (JTT-501), y los divulgados en los documentos WO99/16758, WO99/19313, WO99/20614, WO99/38850, WO00/23415, WO00/23417, WO00/23445, WO00/50414, WO01/00579, WO01/79150, WO02/062799, WO03/004458,

WO03/016265, WO03/018010, WO03/033481, WO03/033450, WO03/033453, WO03/043985, WO 031053976, la solicitud de patente n.º de Ser. 09/664.598, presentada el 18 de septiembre de 2000, Murakami *et al.* Diabetes 47, 1841-1847 (1998), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; otros fármacos sensibilizadores de insulina; agonistas del receptor VPAC2; moduladores de GLK, tales como los divulgados en el documento  
 5 WO03/015774; moduladores de retinoides tales como los divulgados en el documento WO03/000249; inhibidores de GSK 3 $\beta$ /GSK3 tales como 4-[2-(2-bromofenil)-4-(4-fluorofenil-1H-imidazol-5-il)]piridina y los compuestos divulgados en los documentos WO03/024447, WO03/037869, WO03/037877, WO03/037891, WO03/068773, EP1295884, EP1295885 y similares; inhibidores de la glicógeno fosforilasa (HGLPa), tales como CP-368.296, CP-316.819, BAYR3401 y compuestos divulgados en los documentos WOO 1/94300, WO02/20530, WO03/037864, y sales o  
 10 ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; promotores del consumo de ATP, tales como los divulgados en el documento WO03/007990, inhibidores de TRB3; ligandos del receptor de vanilloides, tales como los divulgados en el documento WO03/049702; agentes hipoglucémicos, tales como los divulgados en los documentos WO03/015781 y WO03/040114; inhibidores de la glucógeno sintetasa quinasa 3, tales como los divulgados en el documento WO03/035663, agentes tales como los divulgados en los documentos WO99/51225, US20030134890,  
 15 WO01/24786 y WO03/059870; proteína de unión a ADN sensible a insulina 1 (IRDBP-I), como se divulga en el documento WO03/057827, y similares; antagonistas de la adenosina A2 tales como los divulgados en los documentos WO03/035639, WO03/035640, y similares; agonistas del PPAR $\delta$  tales como GW 501516, GW 590735, y compuestos divulgados en los documentos JP10237049 y WO02/14291; inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DP-IV), tales como isoleucina tiazolidida, NVP-DPP728A (1-[[[2-[(5-cianopiridin-2-il)amino]etil]amino]acetil]-2-ciano(S)-pirrolidina, divulgado en Hughes *et al.*, Biochemistry, 38(36), 11597-11603, 1999), P32/98, NVP-LAF-237, P3298, TSL225 (ácido triptofil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico, divulgado en Yamada *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 8 (1998) 1537-1540), valina pirrolidida, TMC-2A/2B/2C, inhibidores de CD-26, FE999011, P9310/K364, VIP 0177, DPP4, SDZ 274-444, 2-cianopirrolididas y 4-cianopirrolididas, como se divulga en Ashworth  
 20 *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 6, No. 22, pág. 1163-1166 y 2745-2748 (1996), y los compuestos divulgados en los documentos US6395767, USA6573287, USA6395767 (los compuestos divulgados incluyen BMS-477118, BMS-471211 y BMS 538.305), WO99/38501, WO99/46272, WO99/67279, WO99/67278, WO99/61431WO03/004498, WO03/004496, EP1258476, WO02/083128, WO02/062764, WO03/000250, WO03/002530, WO03/002531, WO03/002553, WO03/002593, WO03/000180 y WO03/000181; agonistas de GLP-I tales como exendina 3 y exendina 4 (incluyendo la exendina 4 de polipéptido sintético de 39aa llamada Exenatide®,  
 30 y los compuestos divulgados en los documentos US2003087821 y NZ 504256, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; péptidos que incluyen amlintida y Symlin® (acetato de pramlintida), y activadores de glucoquinasa, tales como los divulgados en el documento US2002103199 (compuestos heteroaromáticos fusionados) y el documento WO02/48106 (compuestos de propionamida isoindolin-1-ona sustituidos).

### 35 *Inhibidores de la fosfodiesterasa*

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en terapia de combinación con un inhibidor de la fosfodiesterasa. Los inhibidores de la PDE son los compuestos que enlentecen la degradación de AMP cíclico (AMPC) y/o GMP cíclico (GMPc) mediante la inhibición de las fosfodiesterasas, lo que puede conducir a  
 40 un aumento relativo de la concentración intracelular de AMPC y/o GMPc. Los posibles inhibidores de la PDE son principalmente las sustancias que deben enumerarse entre la clase que consiste en los inhibidores de la PDE3, la clase que consiste en los inhibidores de la PDE4 y/o la clase que consiste en los inhibidores de la PDE5, en particular las sustancias que pueden designarse como tipos mixtos de inhibidores de la PDE3/4 o como tipos mixtos de inhibidores de la PDE3/4/5. A modo de ejemplo, los inhibidores de la PDE se pueden mencionar tal como se describen y/o reivindican en las siguientes solicitudes de patente y patentes: DE1470341, DE2108438, DE2123328,  
 45 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, EP0294647, EP0300726, EP0335386, EP0357788, EP0389282, EP0406958, EP0426180, EP0428302, EP0435811, EP0470805, EP0482208, EP0490823, EP0506194, EP0511865, EP0527117, EP0626939, EP0664289, EP0671389, EP0685474, EP0685475, EP0685479, JP92234389, JP94329652, JP95010875, patentes de Estados Unidos N.º 4.963.561, 5.141.931, WO9117991, WO9200968, WO9212961, WO9307146, WO9315044, WO9315045, WO9318024, WO9319068, WO9319720, WO9319747, WO9319749,  
 55 WO9319751, WO9325517, WO9402465, WO9406423, WO9412461, 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, DE1 116676, DE2162096, EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345, US6.331.543, US20050004222 (incluyendo los divulgados en las fórmulas I-XIII y los párrafos 37-39, 85-0545 y 557-577) y WO9307124, EP0163965, EP0393500, EP0510562, EP0553174, WO9501338 y WO9603399. Los inhibidores de la PDE5 que pueden mencionarse a modo de ejemplo son RX-RA-69, SCH-51866, KT-734, vesnarrinona, zaprinast, SKF-96231, ER-21355, BF/GP-385, NM-702 y sildenafil (Viagra®). Los inhibidores de la PDE4 que pueden mencionarse a modo de ejemplo son RO-20-1724,  
 65 MEM 1414 (R1533/R1500; Pharmacia Roche), DENBUFILINA, ROLIPRAM, OXAGRELATO, NITRAQUAZONA, Y-590, DH-6471, SKF-94120, MOTAPIZONA, LIXAZINONA, INDOLÁN, 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, TIBENELAST, 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 la PDE3 que pueden mencionarse a modo de ejemplo son SULMAZOL, AMPIZONA, CILOSTAMIDA, CARBAZERÁN, PIROXIMONA, IMAZODÁN, CI-930, SIGUAZODÁN, ADIBENDÁN, SATERINONA, SKF-95654, SDZ-MKS-492, 349-U-85, EMORADÁN, EMD-53998, EMD-57033, NSP-306, NSP-307, REVIZINONA, NM-702, WIN-62582 y WIN-63291, ENOXIMONA y MILRINONA. Los inhibidores de la PDE3/4 que pueden mencionarse a modo de ejemplo son BENAFENTRINA, TREQUINSÍN, ORG-30029, ZARDAVERINA, L-686398, SDZ-ISQ-844, ORG-20241, EMD-54622 y TOLAFENTRINA. Otros inhibidores de la PDE incluyen: cilomilast, pentoxifilina, roflumilast, tadalafil (Cialis®), teofilina y vardenafil (Levitra®), zaprinast (específico de la PDE5).

#### Agentes anticontracciones uterinas

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden usarse en terapia de combinación (por ejemplo, para disminuir o inhibir las contracciones uterinas) con un agente tocolítico que incluye, pero sin limitación, agentes beta-adrenérgicos, sulfato de magnesio, inhibidores de prostaglandinas y bloqueantes del canal de calcio.

#### Agentes antineoplásicos

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en terapia de combinación con agentes antineoplásicos que incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes, epipodofilotoxinas, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides de la vinca, antibióticos antraciclina, agentes de mostaza nitrogenada, y similares. Los agentes antineoplásicos particulares pueden incluir tamoxifeno, taxol, etopósido y 5-fluorouracilo.

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en terapia de combinación (por ejemplo en una composición quimioterapéutica) con terapias antivíricas y de anticuerpos monoclonales.

#### Agentes para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden utilizarse en terapia de combinación (por ejemplo, en la prevención/tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva u otro método descrito en el presente documento) con el agonista parcial del receptor de la nociceptina ORL1, descrito en Dooley *et al.* (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 283 (2): 735-741, 1997). El agonista es un hexapéptido que tiene la secuencia de aminoácidos Ac-RYY (RK) (WI) (RK)-NH<sub>2</sub> ("el polipéptido Dooley"), en donde los paréntesis muestran la variación permisible de restos de aminoácido. Por lo tanto, el polipéptido Dooley puede incluir, pero sin limitación, KYRWR, RYYRWR, KWRYYR, RYYRWK, RYYRWK (todos D-aminoácidos), RYYRIK, RYYRIR, RYYKJK, RYYKIR, RYYKWR, RYYKWK, RYYRWR, RYYRWK, RYYRIK, RYYKWR, RYYKWK, RYYRWK y KYRWRK, en los que los restos de aminoácido están en la forma L, a menos que se especifique otra cosa. Los péptidos GCRA descritos en el presente documento también pueden utilizarse en terapia de combinación con modificaciones del conjugado polipeptídico del polipéptido de Dooley descritas en el documento WO0198324.

### DOSIFICACIÓN

Los niveles de dosificación de los principios activos de una composición farmacéutica también pueden variarse de forma que se logre una concentración transitoria o sostenida del compuesto en un sujeto, en especial en, y alrededor de, el sitio de inflamación o el área enferma, y para dar como resultado la respuesta deseada. Está dentro de la experiencia en la técnica iniciar las dosis del compuesto en niveles inferiores que los necesarios para lograr el efecto deseado y aumentar de forma gradual la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Se entenderá que el nivel de dosis específico para un sujeto particular dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el peso corporal, la salud general, la dieta, la evolución natural de la enfermedad, la vía y el programa de administración, la combinación con uno o más fármacos, y la gravedad de la enfermedad.

Una dosificación eficaz de la composición normalmente estará entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 10 µg y 5 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal. Los ajustes en la dosificación se harán utilizando los métodos que son rutinarios en la técnica y se basarán en la composición particular que se utilice y las consideraciones clínicas.

Los agonistas del receptor de la guanilato ciclase utilizados 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, ungüentos y lociones tópicos, composiciones transdérmicas, otras formulaciones de péptido conocidas y análogos de péptido pegilados. Los agonistas pueden administrarse ya sea como un agente activo único o en combinación con otros fármacos, por ejemplo, un inhibidor de la fosfodiesterasa GMPc dependiente y un agente antiinflamatorio. En otros casos, los

fármacos adicionales deberían administrarse a una dosificación que sea terapéuticamente eficaz, utilizando la técnica existente como guía. Los fármacos pueden administrarse en una composición única o de forma secuencial.

Los niveles de dosificación del agonista del GCR para su uso en los métodos de la invención normalmente son de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 10.000 mg diarios, preferentemente de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 1.000 mg diarios. Sobre la base de una dosis diaria de mg/kg, ya sea proporcionada en dosis individuales o divididas, las dosificaciones normalmente variarán de aproximadamente 0,001/75 mg/kg a aproximadamente 10.000/75 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,005/75 mg/kg a aproximadamente 1.000/75 mg/kg.

La dosis diaria total de cada inhibidor se puede administrar al paciente en una dosis única, o en múltiples subdosis. Normalmente, las subdosis pueden administrarse de dos a seis veces por día, preferentemente de dos a cuatro veces por día e incluso más preferentemente de dos a tres veces por día. Las dosis pueden estar en forma de liberación inmediata o de liberación sostenida suficientemente eficaces para obtener el control deseado sobre la afección médica.

El régimen de dosificación para prevenir, tratar, proporcionar alivio de, o mejorar una afección médica o trastorno, o para proteger de otra forma frente a, o tratar, una afección médica con las combinaciones y composiciones de la presente invención, se seleccionan en conformidad con una diversidad de factores. Estos factores incluyen, pero sin limitación, el tipo, edad, peso, sexo, dieta y estado médico del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración, las consideraciones farmacológicas tales como la actividad, eficacia, perfiles de farmacocinética y toxicología, de los inhibidores particulares empleados, ya sea se utilice un sistema de suministro de fármaco y ya sea que los inhibidores se administren con otros principios activos. Por lo tanto, el régimen de dosificación de hecho empleado puede variar ampliamente y, por lo tanto, desviarse del régimen de dosificación preferente expuesto anteriormente.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1: SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS GCRA

Los péptidos GCRA se sintetizaron utilizando métodos convencionales para la síntesis de péptidos en fase sólida. Se seleccionó una estrategia de grupo protector ya sea Boc/Bzl o Fmoc/tBu, dependiendo de la escala del péptido a producir. En el caso de cantidades menores, es posible obtener el producto deseado utilizando un protocolo Fmoc/tBu, pero para cantidades mayores (1 g o más), es superior Boc/Bzl.

En cada caso, los péptidos GCRA se iniciaron utilizando una resina ya sea Wang (Fmoc) o Merrifield (Boc), o Pam (Boc) precargada. 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 contienen d-Leu C terminal, la resina fue resina Fmoc-dLeu-Wang (D-2535) y Boc-dLeu-Merrifield, resina Boc-dLeu-Pam (Productos de 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 enlazador Ramage (Producto de Bachem D-2200) (Fmoc) o mBHA (Boc) (Producto de Bachem D-1210) y se cargó con el resto C terminal como la primera etapa de síntesis.

#### **Generalidades de Fmoc-tBu**

Cada ciclo sintético consistió en la desprotección con piperidina al 20 % en DMF. Los lavados de la resina se realizaron con DMF e IpOH de forma alterna para hinchar y encoger la resina, respectivamente. La síntesis peptídica elongó la cadena desde el extremo C al extremo N. La química de activación para cada aminoácido fue con HBTU/DIEA en un exceso de 4 veces durante 45 minutos. En las reacciones químicas automatizadas, cada aminoácido se acopló de forma doble para maximizar la eficacia de acoplamiento. Para asegurar la correcta posición de los enlaces disulfuro, los residuos Cys se introdujeron como Cys(Acm) en las posiciones 15 y 7. Cys(Trt) se posicionó en Cys4 y Cys12. Esta estrategia de grupo protector produjo el topoisómero correcto como el producto dominante (75:25). (Para los análogos de enterotoxinas, se utilizó un tercer grupo protector de enlace disulfuro (Mob)).

Para los péptidos que contienen grupos Aeea (aminoetiloxietiloxiacetilo) C terminales, éstos se acoplaron a un enlazador de amida Ramage utilizando la misma reacción química de activación anterior, utilizando un derivado Aeea protegido con Fmoc. La numeración de Cys en estos casos se mantuvo igual y la posición de los grupos protectores también. Para los péptidos que contenían la extensión N terminal de Aeea, la numeración de los restos Cys se aumentará, haciendo a Cys4 Cys7, Cys12 se hace Cys15; Cys7 se hace Cys10 y Cys15 se hace Cys18. El último par se protege con Acm y el par anterior mantiene los grupos Trt.

Para los análogos que contienen sustituciones de D-aminoácidos, estos se introdujeron de forma directa incorporando el derivado protegido de forma correcta en la posición deseada, utilizando la misma reacción química de activación descrita en el presente documento. Para las estrategias de Fmoc, se utilizarían las estrategias Fmoc-

dAsn(Trt)-OH, Fmoc-dAsn(Xan)-OH, Fmoc-dAsp(tBu)-OH, Fmoc-dGlu(tBu)-OH y para las estrategias 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.

5 Cada péptido se escinde del soporte en fase sólida utilizando un cóctel de escisión de TFA:H<sub>2</sub>O:Trisopropilsilano (8,5:0,75:0,75) ml/g de resina durante 2 h a TA. El péptido desprotegido crudo se filtra para eliminar las perlas de resina agotadas y se precipita en dietiléter enfriado en hielo.

10 Cada uno de los enlaces disulfuro se introdujo de forma ortogonal. Brevemente, el producto sintético crudo se disolvió en agua que contenía NH<sub>4</sub>OH para aumentar el pH a 9. Después de la solubilización completa del producto, el enlace disulfuro se hizo entre los restos Cys desprotegidos de Trt mediante titulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El producto monocíclico se purificó por RP-HPLC. El producto monocíclico purificado se trató posteriormente con una solución de yodo para eliminar de forma simultánea los grupos protectores Acn y para introducir el segundo enlace disulfuro.

15 Para los análogos de enterotoxina, el grupo Mob se eliminó a través del tratamiento del producto dicíclico con TFA al 85 % que contenía DMSO al 10 % y tianisol al 5 % durante 2 h a TA.

20 Cada producto se purificó después por RP-HPLC utilizando un sistema de tampón de combinación de TEAP en H<sub>2</sub>O frente a MeCN, seguido de TFA en H<sub>2</sub>O frente a MeCN. Las fracciones altamente puras se combinaron y liofilizaron. El producto final se convirtió a una sal de acetato utilizando intercambio iónico con resina Dow-Ex cargada con acetato o utilizando RP-HPLC, utilizando una etapa de lavado con base con NH<sub>4</sub>OAc seguido de AcOH al 1 % en agua frente a MeCN.

25 También es posible preparar análogos de enterotoxina utilizando una metodología de oxidación aleatoria, utilizando Cys(Trt) en Fmoc o Cys(MeB) en Boc. Después de la escisión, los enlaces disulfuro pueden formarse utilizando parejas redox de intercambio de disulfuro tales como glutatión (red/ox) y/o cisteína/cistina. Este procedimiento producirá un producto plegado en el que las parejas de disulfuro deben determinarse dado que no habría modo de conocer su posición de forma directa.

### 30 **Procedimiento Boc-Bzl**

La síntesis de péptidos se inicia en una resina precargada Merrifield o Pam, o con mBHA para péptidos producidos como amidas C terminales. Cada ciclo sintético consiste en una etapa de desprotección con TFA al 50 % en MeCl<sub>2</sub>. La resina se lava de forma repetida con MeCl<sub>2</sub> y MeOH. La sal de TFA formada se neutraliza con un lavado con base de TEA al 10 % en MeCl<sub>2</sub>. Antes de las etapas de acoplamiento la resina se lava con MeCl<sub>2</sub> y MeOH, y por último con DMF. Se realiza una prueba colorimétrica para asegurar la desprotección. Cada acoplamiento está mediado por carbodiimida diisopropilica con HOBt para formar el éster activo. Cada acoplamiento se deja continuar durante 2 h a TA o durante una noche en acoplamientos difíciles. Los reacoplamientos se realizan con ya sea reactivos de Uronio o Fosfonio, hasta que se obtiene una prueba colorimétrica negativa para aminas primarias libres. La resina se lava después con DMF, MeCl<sub>2</sub> y MeOH, y se prepara para la siguiente etapa de fase sólida. La protección de Cys utiliza Cys(Acn) en las posiciones 7 y 15, y Cys(MeB) en Cys4 y Cys12.

45 La escisión y la desprotección simultánea se llevan a cabo mediante el tratamiento con HF utilizando anisol como un limpiador (9:1:1) ml:ml:g (resina) a 0 °C durante 60 min. Posteriormente, el péptido se extrae de la resina y se precipita en éter enfriado en hielo. La introducción de enlaces disulfuro y la purificación siguen exactamente el mismo protocolo descrito anteriormente para el producto *producido por Fmoc*.

### **EJEMPLO 2: ESTABILIDAD PROTEOLÍTICA *IN VITRO* UTILIZANDO DIGESTIÓN EN FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO (FGS)**

50 La estabilidad del péptido GRCA de acuerdo con la invención se determina en presencia de fluido gástrico simulado (FGS). El péptido GRCA (concentración final de 8,5 mg/ml) se incuba en FGS (peptona proteosa (8,3 g/litro; Difco), D-Glucosa (3,5 g/litro; Sigma), 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), 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). El FGS se prepara el día del experimento y el pH se ajusta a 2,0 ± 0,1 utilizando HCl o NaOH según sea necesario. Tras el ajuste de pH, el FGS se esteriliza por filtración con filtros de membrana de 0,22 µm. SP-304 (concentración final de 8,5 mg/ml) se incuba en FGS a 37 °C durante 0, 15, 30, 45, 60 y 120 min en alícuotas por triplicado. Después de las incubaciones, las muestras se congelan de forma instantánea en hielo seco, después se almacenan en un congelador a -80 °C hasta que se ensayan por duplicado.

### 60 **EJEMPLO 3: ESTABILIDAD PROTEOLÍTICA *IN VITRO* UTILIZANDO DIGESTIÓN EN FLUIDO INTESTINAL SIMULADO (FIS)**

65 La estabilidad del péptido GRCA también se evalúa frente a la digestión con fluido intestinal simulado (FIS). La solución de FIS se preparó por el método como se describe en la Farmacopea de Estados Unidos, edición 24<sup>a</sup>, pág. 2236. La receta para preparar la solución de FIS es como se describe anteriormente. La solución FIS contiene NaCl

(2,05 g/litro; Sigma),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,6 g/litro; Sigma),  $\text{CaCl}_2$  (0,11 g/litro), KCl (0,37 g/litro; Sigma) y Pcreatina 10 mg/ml. El pH se ajusta a 6 y la solución se esteriliza por filtro. Se incuba una solución de SP-304 (8,5 mg/ml) en FGS a 37 °C durante 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 300 min en alícuotas por triplicado. Después de las incubaciones, las mezclas se retiran y se congelan de forma instantánea con hielo seco, y se almacenan en un congelador a -80 °C hasta que se ensayan por duplicado.

La integridad del péptido GRCA se evalúa por HPLC utilizando esencialmente el método descrito para la digestión por FGS.

#### 10 **EJEMPLO 4: ENSAYOS DE ESTIMULACIÓN DE GMP CÍCLICO**

La capacidad del péptido GCRA para unirse a, y activar el receptor de la GC-C intestinal, se analiza utilizando la línea celular de carcinoma de colon humano T84. Las células de carcinoma de colon T84 humanas se obtienen de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Las células se cultivan en una mezcla 1:1 en medio F-12 de Ham y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Las células se alimentan con medio recién preparado cada tercer día y se dividen a una confluencia de aproximadamente el 80 %.

La actividad biológica de los péptidos de GCRA se ensaya como se informa anteriormente (15). Brevemente, se lavan dos veces las monocapas confluentes de células T-84 en placas de 24 pocillos con 250 µl de DMEM que contiene HEPES 50 mM (pH 7,4), se preincuban a 37 °C durante 10 min con 250 µl de DMEM que contiene HEPES 50 mM (pH 7,4) e isobutilmetilxantina (IBMX) 1 mM, seguido de la incubación con péptidos GCRA (0,1 nM a 10 µM) durante 30 min. El medio se aspira y la reacción se finaliza por la adición de ácido perclórico al 3 %. Después de la centrifugación, y de la neutralización con NaOH 0,1 N, se utiliza el sobrenadante de forma directa para las mediciones de GMPc utilizando un kit de ELISA (Caymen Chemical, Ann Arbor, Mich.).

#### 20 **EJEMPLO 5: PÉPTIDOS PEGILADOS**

La otra estrategia para hacer que los péptidos sean más resistentes frente a las digestiones con proteasas digestivas, es pegarlos en el N y C terminal. El péptido GCRA se pegila con el grupo de ácido aminoetiloxi-etiloxiacético (Aeea) en el C terminal (o en el N terminal o en ambos extremos). La síntesis de GMP cíclico en las células T84 se mide mediante el método como se describe anteriormente.

#### 35 **EJEMPLO 6: COMBINACIÓN DE LOS AGONISTAS DEL RECEPTOR DE LA GUANILATO CICLASA CON INHIBIDORES DE LA FOSFODIESTERASA**

La regulación de las concentraciones intracelulares de nucleótidos cíclicos (es decir, AMPc y GMPc) y, por lo tanto, la señalización a través de estos segundos mensajeros, en general se considera que está dirigida por sus velocidades de producción frente a sus velocidades de destrucción dentro de las células. Por lo tanto, los niveles de GMPc en los tejidos y órganos también pueden regularse mediante los niveles de expresión de las fosfodiesterasas GMPc específicas (GMPc-PDE), las cuales, en general, tienen expresión aumentada en el cáncer y en las enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, una combinación que consiste en un agonista de la GC-C con un inhibidor de la GMPc-PDE podría producir un efecto sinérgico sobre los niveles de GMPc en los tejidos y órganos diana.

Sulindaco Sulfona (SS) y Zaprinast (ZAP) son dos de los inhibidores conocidos de la GMPc-PDE y han mostrado inducir apoptosis en células cancerosas a través de un mecanismo dependiente de GMPc. Se evalúan SS y ZAP en combinación con el péptido GCRA para observar si estos inhibidores de la PDE tienen algún efecto sinérgico sobre la acumulación intracelular de GMPc.

#### 50 **EJEMPLO 7: UN ESTUDIO DE BÚSQUEDA DEL INTERVALO DE LA DOSIS DE TOXICIDAD ORAL EN MONOS CINOMOLGOS.**

El objetivo del estudio es determinar la toxicidad de los péptidos GRCA de acuerdo con la invención, después de una única administración oral por sonda al mono cinomolgo, para permitir la evaluación de la reversibilidad de cualquiera de los cambios después de un período mínimo de observación/eliminación de 7 días. Cada péptido GRCA de acuerdo con la invención se proporcionará a dos niveles de dosis distintos.

#### 60 **Diseño experimental**

El artículo de ensayo (por ejemplo, los péptidos GRCA de acuerdo con la invención) y de control se administrarán en tres fases separadas por un período mínimo de observación de 7 días. Cada fase consistirá en una administración oral por sonda única a monos cinomolgos hembra, como se indica en las tablas a continuación:

Fase 1:

Se transferirán ocho monos cinomolgos hembra que no son sin tratamiento previo desde la Colonia de monos de reserva de ITR y se asignarán a cuatro grupos de dosis como sigue:

5

Número del grupo	Designación del grupo	Día de Estudio	Nivel de dosis (mg/kg)	Concentración de la dosis (mg/ml)	Volumen de la dosis (ml/kg)	Número de animales (hembras)
1	Control/Vehículo	1	0	0	10	2
		4				
2	Péptidos de ensayo	1	1	0,1	10	2
		4				
		4				

Después de la finalización de la dosificación de la Fase 1, todos los monos se observarán durante 33 días. Después de la finalización del período de observación, todos los monos se transferirán de nuevo a la Colonia de monos de reserva de ITR.

10

Fase 2:

Se transferirán desde la Colonia de monos de reserva de ITR los mismos ocho monos cinomolgos hembra que no son sin tratamiento previo utilizados como anteriormente en la Fase 1, y se asignarán a cuatro grupos de dosis como sigue:

15

Número del grupo	Designación del grupo	Día de estudio	Nivel de dosis (mg/kg)	Concentración de la dosis (mg/ml)	Volumen de la dosis (ml/kg)	Número de animales (hembras)
1	Control/Vehículo	1	10	1	10	2
2	Péptidos de ensayo	1	10	1	10	2

Después de la finalización de la dosificación de la Fase 2, todos los monos se observarán durante un mínimo de 7 días.

20

**Vía de administración**

Se ha elegido la vía oral de administración debido a que es una vía terapéutica preferente en el ser humano.

25

**Preparación de los artículos de ensayo y de control/vehículo**

Los artículos de ensayo y de control/vehículo se prepararán de forma reciente el día de la dosificación en agua destilada fría (mantenida en un baño de agua helada). Se añadirá una cantidad suficiente de polvo del artículo de ensayo a una cantidad apropiada de agua destilada para lograr la concentración deseada. Las formulaciones de dosis se mezclarán por inversión simple.

30

**Análisis de la concentración del artículo de ensayo y de la estabilidad de las formulaciones de dosis**

Para la posible confirmación de la concentración y estabilidad del artículo de ensayo en las formulaciones, el primer día de dosificación se tomarán de cada grupo, incluyendo el artículo de control/vehículo, muestras representativas de la mitad de cada concentración, como se indica a continuación. Las muestras se recogerán inmediatamente después de la preparación el Día 1 y otra vez después de acabar la dosificación ese día, y se almacenarán congeladas (aproximadamente 80 °C nominales) en viales con tapa a rosca de 20 ml. Por lo tanto, los viales de formulación de dosis restantes se devolverán al Departamento de farmacia tan pronto como sea posible tras la finalización de la dosificación.

35

40

Grupo 1: 1,5 ml por duplicado de la mitad, el Día 1 (predosis y posdosis).

Grupo 2: 1,5 ml por duplicado de la mitad, el Día 1 (predosis y posdosis).

45

Grupo 3: 1,5 ml por duplicado de la mitad, el Día 1 (predosis y posdosis).

Grupo 4: 1,5 ml por duplicado de la mitad, el Día 1 (predosis y posdosis).

Durante todos los procedimientos de muestreo las formulaciones se mantendrán frías en un baño de agua helada.

Las formulaciones se agitarán de forma continua con una barra agitadora durante un mínimo de 15 minutos antes del muestreo.

5 Las muestras se conservarán congeladas (aproximadamente -80 °C nominales) en el ITR hasta que el Patrocinador solicite que se envíen a un laboratorio designado por el mismo para el análisis. Las muestras pueden desecharse una vez que el analista y el director del estudio determinen que ya no son necesarias. El uso de estas muestras se registrará en los datos sin procesar.

10 Si se analizan, el Investigador Principal preparará un informe sobre la Formulación de Dosis (Análisis de formulación) y se proporcionará al ITR para la inclusión en el informe final.

#### **Sistema de prueba**

15 Especie/Cepa: Mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*)  
Fuente: orldwide Primates Inc.,  
P.O. Box 971279  
Miami, Florida, 33187, EE.UU.  
y

Covance Research Products Inc.  
P.O. Box 549  
Alice, Texas, 78333, EE.UU.  
N.º total de monos en el estudio: 8 hembras que no son sin tratamiento previo  
Intervalo de peso corporal: 2-4 kg al inicio del tratamiento  
Intervalo de edad al inicio: Adultos jóvenes al inicio del tratamiento  
Período de aclimatación: Los animales se transferirán desde la colonia de monos de reserva del ITR. Por lo tanto, se los considera como completamente aclimatados al entorno del laboratorio.

Los intervalos de edad y peso corporal reales se indicarán en el informe final.

#### **Administración de los artículos de ensayo y de control/vehículo**

20 Los artículos de ensayo y de control/vehículo se administrarán mediante la administración oral por sonda utilizando una sonda acoplada a una jeringuilla, en tres fases separadas por un período mínimo de observación/eliminación de 7 días. Cada sesión de dosificación consistirá en una única administración oral por sonda. La sonda se lavará abundantemente con 3 ml de agua de ósmosis inversa inmediatamente después de la administración de la  
25 formulación de dosis, para asegurar que se ha suministrado al animal el volumen de la dosis completo. El volumen de dosis será de 10 ml/kg para todos los animales, incluyendo los controles. El volumen real administrado a cada mono en el día 1 de cada fase se calculará utilizando los pesos corporales del día 1 de cada fase.

30 Las formulaciones de dosificación se mantendrán frías durante la administración de la dosis, colocándolas en un baño de agua helada.

Las formulaciones de dosificación deben colocarse en una placa de agitación durante un mínimo de 15 minutos antes del inicio de la dosificación y deben mantenerse en la placa de agitación a lo largo de todo el procedimiento de dosificación.

35 Las formulaciones de dosificación deben utilizarse dentro de las 2 horas de la preparación.

#### **Observaciones clínicas**

40 Los signos clínicos en el laboratorio (mal estado de salud, cambios del comportamiento, etc.) se registraron como se indica a continuación, excepto en los días de examen clínicos detallado, en donde los signos clínicos matutinos en el laboratorio se reemplazarán por un examen clínico detallado (ECD). Durante los exámenes de los signos clínicos en el laboratorio regulares y los detallados, se pondrá particular atención a las deposiciones con respecto a la cantidad de deposiciones producidas, descripción de las deposiciones, etc.

45 Los signos clínicos en el laboratorio se realizarán como sigue:

Durante el período de pretratamiento y durante los períodos de observación de 7 días (mínimos): tres veces por día con un mínimo de 3 horas entre cada ocasión.

En el día de dosificación de la Fase 1: predosis, 2, 4, 6, 8 y 24 horas posdosificación

En el día de dosificación de la Fase 2: predosis, de forma continua para las primeras 4 horas posdosis y a las 6, 8 y 24 horas posdosificación

En el día de dosificación de la Fase 3: predosis, de forma continua para las primeras 4 horas posdosis y a las 6, 8 y 24 horas posdosificación

Se realizará un examen clínico detallado de cada mono una vez en el momento de la transferencia de los animales y una vez por semana partir de entonces.

Los animales para los que se juzgue que el estado de salud garantiza la evaluación adicional, se examinarán por parte de un Veterinario Clínico, o por un técnico que trabaje bajo la supervisión del Veterinario Clínico. Cualquiera de los tratamientos recomendados por el veterinario solo se realizará una vez que se haya obtenido el consentimiento del Director del Estudio. Cuando sea posible, antes de la administración de los fármacos terapéuticos se consultará al Patrocinador.

Los pesos corporales se registrarán para todos los animales una vez al día desde el día de la transferencia hasta el final del estudio.

Se registrará el consumo de alimento para todos los animales una vez al día desde el día de la transferencia hasta el final del estudio.

Las jaulas se limpiarán antes del inicio del consumo diario de alimento para asegurar que no quedan galletas alimentarias en la jaula. Los monos se alimentarán con 7 galletas antes de las 12 pm y 7 galletas después de las 12 pm. Se registrará la suma del número total de galletas proporcionadas por día.

La mañana siguiente, se realizará una comprobación visual para observar cuántas galletas quedan en la jaula. Se registrará el número de galletas enteras que quedan en la tolva de alimentos o en la bandeja. Para calcular el número de galletas consumidas se restará el número de galletas enteras que quedaron del número total de galletas proporcionadas.

#### **EJEMPLO 8: MODELO DE SECRECIÓN INTESTINAL EN RATÓN LACTANTE (ENSAYO SUMI (del inglés: *suckling mouse model of intestinal secretion*))**

Los péptidos GCRA descritos en el presente documento pueden analizarse por su capacidad para aumentar la secreción intestinal utilizando un modelo de secreción intestinal en ratón lactante. En este modelo, se administra un péptido GCRA a ratones lactantes que tienen entre siete y nueve días de edad. Tras el sacrificio de los ratones, se disecciona el tracto gastrointestinal desde el estómago hasta el ciego ("intestinos"). Lo que queda ("la canal") así como los intestinos se pesan y se calcula la proporción del peso de los intestinos con respecto a la canal. Si la proporción está por encima de 0,09, se puede concluir que el compuesto de ensayo aumenta la secreción intestinal. Los controles para este ensayo pueden incluir SP-304 de tipo silvestre, el polipéptido ST y Zelnorm®.

Modelo de contorsión inducida por fenilbenzoquinona. Para evaluar la actividad de control del dolor de los péptidos GCRA descritos en el presente documento puede utilizarse el modelo de contorsión inducida por PBQ. Este modelo se describe en Siegmund *et al.* (1957 Proc. Soc. Exp. Bio Med. 95:729-731). Brevemente, una hora después de la dosificación oral con un compuesto de ensayo, por ejemplo, un péptido GCRA, morfina o vehículo, se inyecta al ratón por vía intraperitoneal una solución de fenilbenzoquinona (PBQ) al 0,02 % (12,5 ml/kg). Para proporcionar una evaluación cinética se registra la cantidad de estiramientos y contorsiones desde el 5º al 10º minuto tras la inyección de PBQ, y también pueden contarse entre los minutos 35º y 40º y entre los minutos 60º y 65º. Los resultados se expresan como el número de estiramientos y contorsiones (media ± ETM), y el porcentaje de variación del umbral nociceptivo se calcula a partir del valor medio del grupo tratado con vehículo. La significación estadística de cualquiera de las diferencias entre los grupos tratados y el grupo de control se determina por una prueba de Dunnett, utilizando la varianza residual tras un análisis de la varianza de una vía ( $P < 0,05$ ), utilizando el programa informático SigmaStat.

#### **EJEMPLO 9: DETERMINACIÓN DE LA PROPIEDAD FARMACOCINÉTICA DE LOS PÉPTIDOS GCRA**

Se extraen muestras de suero de sangre completa de los ratones expuestos (ratones dosificados por vía oral o por vía intravenosa con péptido (o péptidos) GCRA descritos en el presente documento) y de control, después se las inyecta de forma directa (10 ml) en una columna de extracción en fase sólida (EFS) en línea (columna Waters Oasis HLB 25 µm, 2,0 x 15 mm, conexión directa) sin procesamiento adicional. La muestra en la columna de EFS se lava con una solución de metanol al 5 % dH<sub>2</sub>O al 95 % (2,1 ml/min, 1,0 minutos), después se carga en una columna analítica 0 utilizando una válvula conmutadora que coloca la columna de EFS en una trayectoria de flujo invertida sobre la columna analítica (columna Waters Xterra MS C8 5 µm IS, 2,1 x 20 mm). La muestra se eluye de la columna analítica con un gradiente de fase inversa (Fase Móvil A: hidróxido de amonio 10 mM en dH<sub>2</sub>O, Fase Móvil

B: hidróxido de amonio 10 mM en acetonitrilo al 80 % y metanol al 20 %; B al 20 % durante los primeros 3 minutos, después se incrementa hasta B al 95 % a lo largo de 4 min y se mantiene durante 25 min, todo a un caudal de 0,4 ml/min). A los 9,1 minutos, el gradiente retorna a las condiciones iniciales de B al 20 % durante 1 min. El polipéptido se eluye de la columna analítica y se detecta mediante una espectrometría de masa con triple cuadrupolo (MMR, 764 (estado de carga +2) > 182 (estado de carga +1) Da; voltaje de cono = 30 V, colisión = 20 eV, resolución de precursor = 2 Da en el pico de base; resolución de producto = 2 Da en el pico de base). La respuesta del instrumento se convierte en unidades de concentración mediante la comparación con una curva patrón utilizando cantidades conocidas de polipéptido (o polipéptidos) sintetizado de forma química, preparado e inyectado en plasma de ratón utilizando el mismo procedimiento.

De manera similar, se determinan las propiedades farmacocinéticas en ratas utilizando la metodología LCMS. Las muestras de plasma de rata que contienen el péptido GCRA se extraen utilizando una placa de extracción en fase sólida (EFS) de 96 pocillos Waters Oasis MAX. Se mezcla un volumen de 200 µl de plasma de rata con 200 µl de polipéptido marcado con <sup>13</sup>Cg, <sup>15</sup>N en el pocillo de una placa de EFS preparada. Las muestras se extraen a lo largo de la fase estacionaria con vacío de 15 mm Hg. Todas las mezclas se enjuagan con 200 µl de hidróxido de amonio al 2 % en agua seguido de 200 µl de metanol al 20 % en agua. Las muestras se eluyen con volúmenes consecutivos de 100 µl de ácido fórmico/agua/metanol 5/20/75 y 100 µl de ácido fórmico/agua/metanol 5/15/80. Las muestras se secan en nitrógeno y se resuspenden en 100 µl de metanol al 20 % en agua. Las muestras se analizan mediante un espectrómetro de masas Waters Quattro Micro acoplado a una bomba binaria Waters 1525 con un automuestreador Waters 2777. Se inyecta un volumen de 40 µl de cada muestra en una columna Thermo Hypersil GOLD C18 (2,1 x 50 mm, 5 µm). El polipéptido se eluye mediante un gradiente a lo largo de 3 minutos con acetonitrilo y agua que contiene ácido trifluoroacético al 0,05 %. El espectrómetro de masas Quattro Micro se ejecuta en el modo de control de reacción múltiple (CRM) utilizando las transiciones de masas de, por ejemplo, 764>182 o 682>136. Utilizando esta metodología, el polipéptido se administra a las ratas por vía oral y por vía i.v. a 10 mg/kg. Se determinan las propiedades farmacocinéticas, incluyendo el área bajo la curva y la biodisponibilidad.

#### **EJEMPLO 10: EFECTO DE EXPERIMENTOS RELACIONADOS CON LA DIURESIS SOBRE LA DIURESIS Y LA NATRIURESIS**

El efecto de los péptidos GCRA descritos en el presente documento sobre la diuresis y la natriuresis puede determinarse utilizando una metodología similar a la descrita en el documento WO06/001931 (ejemplos 6 (pág. 42) y 8 (pág. 45)). Brevemente, el polipéptido/agonista descrito en el presente documento (180 pmol) se infunde durante 60 minutos en un grupo de 5 ratones o primates anestesiados. Dado un volumen de plasma de rata estimado de 10 ml, la velocidad de infusión es aproximadamente 3 pmol/ml/min. Se controlan la tensión arterial, la producción de orina y la excreción de sodio durante aproximadamente 40 minutos antes de la infusión, durante la infusión y durante aproximadamente 50 minutos tras la infusión, para medir el efecto de los péptidos GCRA sobre la diuresis y la natriuresis. Para la comparación, se infunde con solución salina normal un grupo de cinco ratas de control. Se puede evaluar la orina y la excreción de sodio. También se puede determinar la respuesta a la dosis. El polipéptido/agonista de la GC-C descrito en el presente documento se infunde en ratones o primates por vía intravenosa a lo largo de 60 minutos. Se recoge a orina a intervalos de 30 minutos hasta los 180 minutos después de la finalización de la infusión del polipéptido/agonista de la GC-C, y se determinan el volumen de orina, la excreción de sodio y la excreción de potasio para cada intervalo de recolección. La tensión arterial se controla de forma continua. Para cada dosis se puede determinar una relación dosis-respuesta para el volumen de orina, la excreción de sodio y de potasio. También se puede determinar la concentración plasmática del polipéptido/agonista de la GC antes y después de la infusión i.v.

Experimento de diuresis en ratón o primate: una vez que se ha logrado un nivel apropiado de anestesia, se inserta un catéter de poliuretano estéril en la uretra, y se asegura utilizando 1 - 2 gotas de pegamento de contacto veterinario aplicado a la unión uretra/catéter. Después, se les administra a los animales vehículo o artículo de ensayo por vía intravenosa o intraperitoneal. Se permite que los animales recuperen la conciencia y se registra de forma periódica para cada rata el volumen de orina excretada a lo largo de 1-5 horas.

#### **Referencias:**

1. Currie, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 947-951 (1992).
2. Hamra, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 10464-10468 (1993).
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).
- 5 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.
- 10 12. Basoglu, *et al.*, en: Proceedings of the Second FEPS Congress, 29 de junio - 4 de julio de 1999, Praga, República Checa., [lf2.cuni.cz/physiolres/feps/basoglu](http://lf2.cuni.cz/physiolres/feps/basoglu)
13. Sindic, *et al.*, J. Biol. Chem. 11 de marzo de 2002, *manuscrito M110627200 (en prensa)*.
- 15 14. Askling, J., Dickman, P. W., Karlen, P., Brostrom, O., Lapidus, A., Lofberg, R., y Ekbohm, A. Colorectal cancer rates among first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. Lancet, 357: 262-266.
- 20 15. Provenzale, D. y Onken, J. Surveillance issues in inflammatory bowel disease: Ulcerative colitis. J Clin Gastroenterol, 32: 99-105, 2001.
- 25 16. Ettore, G. M, Pescatori, M., Panis, Y., Nemeth, J., Crescenzi, A., y Valleur, P. Mucosal changes in ileal pouches after restorative proctocolectomy for ulcerative and Crohn's colitis. Dis Colon Rectum, 43: 1743-1748, 2000.
17. Shinozaki M, Watanabe T, Kubota Y, Sawada T, Nagawa H, Muto T. High proliferative activity is associated with dysplasia in ulcerative colitis. Dis Colon Rectum, 43: S34-S39, 2000.
- 30 18. Deschner, E. E., Winawer, S.J., Katz, S., Katzka, I., y Kahn, E. Proliferative defects in ulcerative colitis patients. Cancer Invest, 1: 41-47, 1983.
19. Wong, W. M., y Wright, N. A. Cell proliferation and gastrointestinal mucosa. J Clin Pathol, 52: 321-333.
- 35 20. Potten, C. S., Wilson, J. W., y Booth, C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells. Stem Cells, 15: 82-93.
21. Bhakdi, *et al.*, Infect. Immun. 57: 3512-3519 (1989).
- 40 22. Hughes, *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 30567-30576 (1997).
23. Cermak, *et al.*, Pflugers Arch. 43: 571-577 (1996).
- 45 24. Wu, *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 14860-14866 (1997).
25. Shailubhai *et al.*, Cancer Research 60, 5151-5157 (2000)
26. Shailubhai *et al.*, Curr. Opin. Drug Disc. Dev. 5(2): 261-268, 2002.
- 50 27. Collins, SM. J Clin Gastroenterol. 41 Suppl 1: S30-32 (2007)
28. Ramamoorthy S *et al.*, J Biol Chem. 282(16): 11639-11647 (2007)
- 55 29. Shailubhai *et al.*, Guanilib, an agonist of Guanylate C, is a newclass of oral drug candidate that ameliorates inflammation in models of experimental colitis. [resumen]: En Crohn's and Colitis Foundation of America, 2007.
30. Shailubhai *et al.*, Guanilib, an agonist of Guanylate C, is a newclass of oral drug candidate for GI disorders and colon cancer. [resumen]: En GTCbio, 2008.
- 60 31. Shailubhai *et al.*, SP-304 to Treat GI Disorders- Effects of a Single, Oral Dose of SP-304 In Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Healthy Volunteers. [resumen]; En Digestive Disease Week, 2009.
- 65 32. Shailubhai *et al.*, Guanylin Peptides: New Class of Oral Drug Candidates. [resumen] En World Congress, 2007.

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 5 2. Una composición farmacéutica en forma farmacéutica unitaria que comprende un péptido agonista del receptor de la guanilato ciclasa que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2, presente en una cantidad terapéuticamente eficaz y un transportador, excipiente o diluyente farmacéutico.
- 10 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que la forma farmacéutica unitaria se selecciona del grupo que consiste en un comprimido, una cápsula, una solución o una formulación de inhalación.
- 15 4. Un agonista de la guanilato ciclasa que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en Colitis Ulcerosa, Síndrome del colon irritable (SCI), enterocolitis necrosante (ECN), dispepsia no ulcerosa, pseudo obstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudo obstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, estreñimiento asociado con el uso de analgésicos opioides, enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), estreñimiento posquirúrgico, gastroparesis, estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos, acidez gástrica, mala motilidad gastrointestinal, insuficiencia cardiaca congestiva, hipertensión, hiperplasia prostática benigna (HPB), cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer de glándula salival o cáncer de piel, bronquitis, inflamación de tejidos, inflamación de  
20 órganos, inflamación respiratoria, asma y EPOC.
- 25 5. Un agonista de la guanilato ciclasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho tratamiento o prevención comprende adicionalmente administrar una dosis eficaz de inhibidor de una fosfodiesterasa GMPc específica.
- 30 6. Un agonista de la guanilato ciclasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho tratamiento o prevención comprende adicionalmente administrar a dicho paciente una dosis eficaz de un inhibidor de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc, de forma ya sea simultánea o secuencial con dicho agonista del receptor de la guanilato ciclasa.
- 35 7. Un agonista de la guanilato ciclasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho inhibidor de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc se selecciona del grupo que consiste en sulindaco sulfona, zaprinast y motapizona, vardenafil y sildenafil.
- 40 8. Un agonista de la guanilato ciclasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho tratamiento o prevención comprende adicionalmente administrar una dosis eficaz de al menos un agente antiinflamatorio.
9. Un agonista de la guanilato ciclasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que un agente antiinflamatorio es un fármaco antiinflamatorio esteroide o no esteroide (AINE).
10. El uso de un péptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad humana.