

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 589**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2011 PCT/US2011/025274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11103311**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2011 E 11706694 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2536742**

54 Título: **Tratamientos para trastornos intestinales**

30 Prioridad:

17.02.2010 US 305465 P

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

23.10.2017

73 Titular/es:

**IRONWOOD PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
301 Binney Street
Cambridge, Massachusetts A 02142, US**

72 Inventor/es:

**FRETZEN, ANGELIKA;
ZHAO, HONG y
KESSLER, MARCO**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 638 589 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

Tratamientos para trastornos intestinales

Campo de la invención

Esta invención se refiere a péptidos, composiciones y su uso en métodos para tratar trastornos gastrointestinales.

5 Antecedentes

Los trastornos gastrointestinales (GI) incluyen el síndrome del intestino irritable (IBS, de sus siglas en inglés) que es un trastorno crónico frecuente del intestino que afecta de 20 a 60 millones de personas sólo en los Estados Unidos (Lehman Brothers, Global Healthcare-Irritable bowel syndrome industry update, Septiembre de 1999). El IBS es el trastorno más frecuente diagnosticado por los gastroenterólogos, y es la causa del 12% de las visitas a médicos de atención primaria (Camilleri 2001, *Gastroenterology* 120:652-668). En los Estados Unidos, se estima que el impacto económico del IBS es de 25 miles de millones de dólares anuales, por costes directos de la utilización de la atención sanitaria y los costes indirectos del absentismo laboral (Talley 1995, *Gastroenterology* 109:1736-1741). Los pacientes con IBS tienen tres veces más absentismo laboral, y presentan una calidad de vida reducida. Existe una enorme necesidad sanitaria insatisfecha de los pacientes que padecen de IBS, ya que existen pocas opciones de prescripción para tratar el IBS.

Los pacientes con IBS padecen dolor abdominal y de un patrón intestinal alterado. Se han definido tres subgrupos de pacientes con IBS en base al hábito predominante del intestino:

Síndrome intestinal irritable con estreñimiento predominante (c-IBS), síndrome intestinal irritable con diarrea predominante (d-IBS) o alternancia entre los dos síndromes intestinales irritables (a-IBS). Se estima que las personas que padecen de c-IBS es del intervalo del 20-50% de los pacientes con IBS que se citan el 30% con más frecuencia. A diferencia de los otros dos subgrupos que tienen una proporción por sexo similar, el c-IBS es más común en las mujeres (proporción de 3:1) (Talley et al. 1995, *Am. J. Epidemiol.* 142:76-83).

La definición y criterios de diagnóstico para el IBS se han formalizado en los "Criterios de Roma" (Drossman et al. 1999, *Gut* 45: Suppl II: 1-81), que son muy aceptados en la práctica clínica. Recientemente, existen cada vez más pruebas que evidencian un papel inflamatorio en la etiología de la IBS. Los informes indican que los subgrupos de los pacientes con IBS tienen un pequeño pero significativo incremento de la inflamación colónica y de los mastocitos, óxido nítrico (NO) y sintasa (iNOS) inducible aumentados y la expresión de citoquinas inflamatorias alterada (revisados por Talley 2000, *Medscape Coverage of DDW week*).

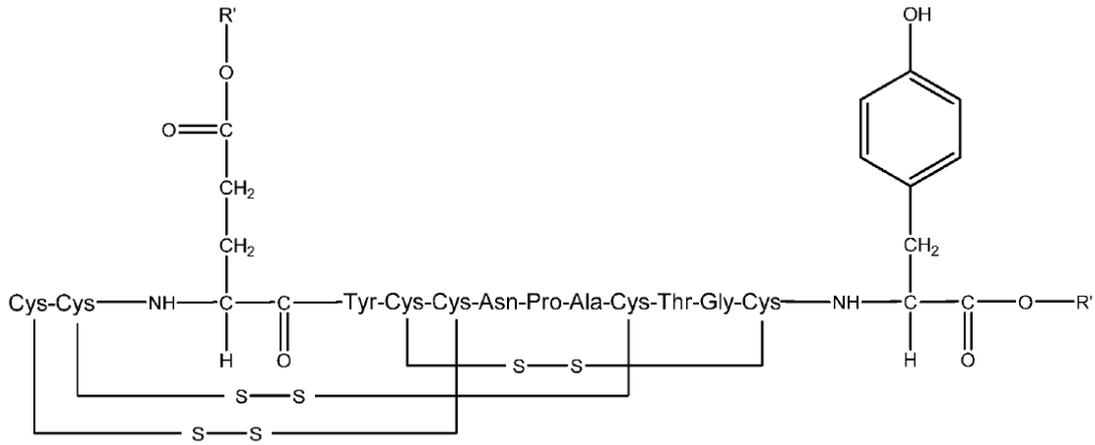
Los trastornos gastrointestinales pueden también incluir estreñimiento, por el cual hasta 34 millones de americanos sufren de síntomas asociados con el estreñimiento crónico (CC, de sus siglas en inglés) y a 8,5 millones de pacientes se les ha aplicado tratamiento. Los pacientes con CC a menudo experimentan heces duras y grumosas, esfuerzo durante la defecación, una sensación de evacuación incompleta, y menos de tres deposiciones por semana. El malestar e hinchazón del CC afecta significativamente a la calidad de vida de los pacientes alterando su capacidad para trabajar y participar en las actividades típicas diarias.

La mitad de los pacientes con CC no están satisfechos con los tratamientos disponibles actualmente para el CC. Por tanto, sigue existiendo una necesidad de nuevos compuestos y métodos para tratar el CC.

Las Patentes U.S. 7.304.036 y 7.371.727 divulgan péptidos que actúan como agonistas del receptor de guanilato ciclasa C (GC-C) para el tratamiento de los trastornos gastrointestinales. Un péptido particular que se divulga es

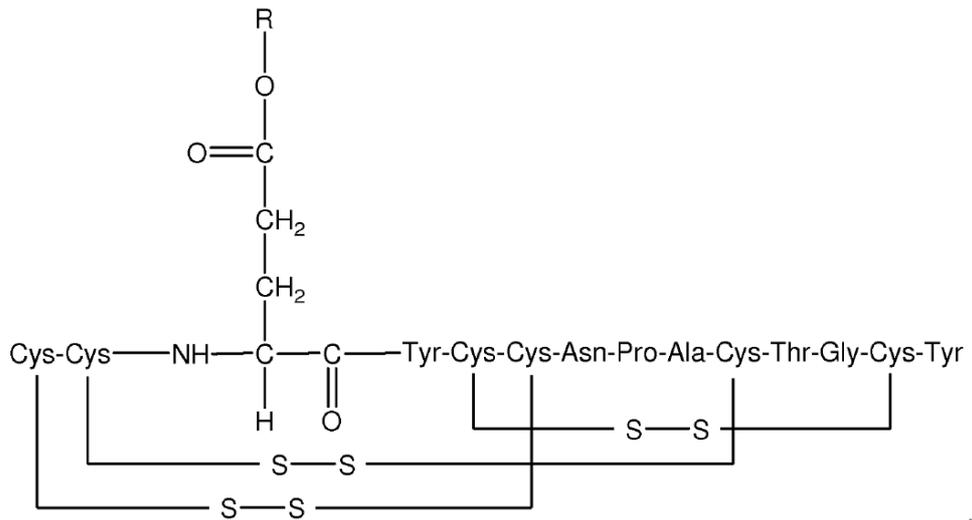
Un aspecto de la presente divulgación proporciona un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende la secuencia aminoácida Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr, en donde al menos un grupo carboxilo del péptido es un éster de alquilo que tiene la fórmula (-COOR) en la que R es un alquilo de C₁₋₆.

5 En una realización el péptido comprende la estructura aminoácida de:



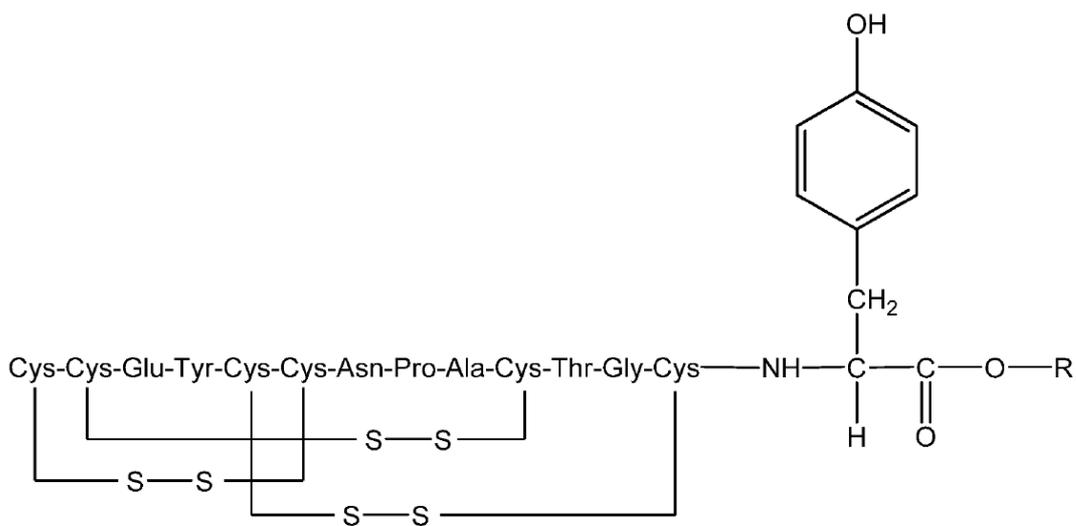
o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde R' es H o un alquilo de C₁₋₆, y al menos un R' es un alquilo de C₁₋₆.

Un segundo aspecto de la presente divulgación proporciona un péptido que comprende la estructura aminoácida de:



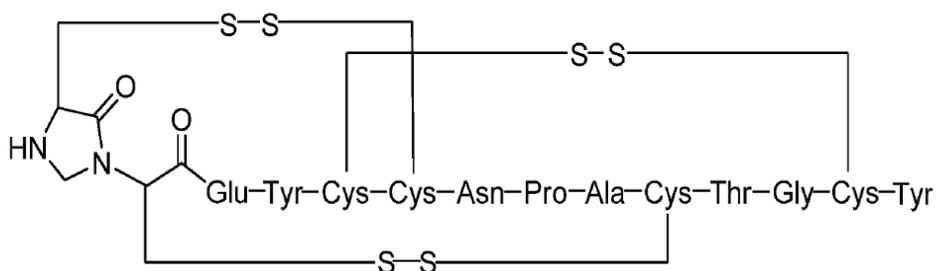
10 o una

sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde R es un alquilo de C₁₋₆; o un péptido que comprende la estructura aminoácida de:



o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde R es un alquilo de C₁₋₆.

Un tercer aspecto de la presente divulgación proporciona un péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende la estructura aminoácida de:



5

Un cuarto aspecto de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de la presente divulgación.

Un quinto aspecto de la presente divulgación proporciona un método para tratar un trastorno gastrointestinal, que incluye administrar una composición farmacéutica según la presente divulgación.

10 Se establecen los detalles de una o más realizaciones de la divulgación en la descripción adjunta.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la respuesta de dosis de ejemplos de péptidos de la presente divulgación en un ensayo de GMP-c para una línea celular T84.

15 La Figura 2 muestra un ejemplo de un análisis de ejemplos de péptidos mediante RP-HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa), en donde "Cys₁-IMD" se refiere al derivado de imidazolidinona de linaclotida modificada en su grupo amino N-terminal.

La Figura 3 muestra la unión específica de linaclotida y Cys₁-IMD a la superficie celular de los receptores GC-C en las células T84 en un ensayo de unión a un radioligando competitivo.

La Figura 4 muestra la respuesta de dosis de ejemplos de péptidos en el ensayo de GMP-c para una línea celular T84.

Las Figuras se proporcionan a modo de ejemplo, y no se destinan a limitar el alcance de la presente invención.

Descripción detallada

5 La guanilato ciclasa C (GC-C) es un receptor transmembrana que se localiza en la superficie apical de las células epiteliales del estómago e intestino. El receptor tiene un dominio de unión a un ligando extracelular, una única región transmembrana y un dominio guanilil ciclasa C-terminal. Cuando un ligando se une al dominio extracelular del GC-C, el dominio catalítico intracelular cataliza la producción de GMP-c a partir del GTP. *In vivo*, este incremento de GMP-c intracelular inicia una cascada de acontecimientos que conduce al incremento de la secreción de cloruro y bicarbonato en el lumen intestinal, incremento del pH luminal, descenso de la absorción de sodio luminal, incremento de la secreción de fluido, y aceleración del tránsito intestinal. El GMP-c se secreta de forma bidireccional desde el epitelio hasta la mucosa y el lumen. Los péptidos y las composiciones de la presente divulgación se unen al receptor GC-C intestinal que es un regulador del fluido y del equilibrio electrolítico en el intestino.

15 En algunas circunstancias puede ser deseable tratar a los pacientes con una variante o modificación del péptido que se une y activa a los receptores GC-C intestinales, pero es menos activo o más activo que la forma no variable de un péptido. Se puede presentar una actividad reducida a partir de una afinidad menor por el receptor o una capacidad reducida para activar el receptor una vez se une, o se reduce la estabilidad del péptido. El incremento de la actividad se puede conseguir a partir de una afinidad mayor por el receptor o una menor capacidad para activar el receptor una vez se une o una menor estabilidad del péptido.

20 Descripción de Ejemplos de Péptidos:

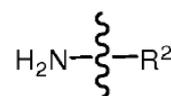
En varias realizaciones de la presente divulgación, se puede modificar un péptido en donde al menos un grupo carboxilo del resto aminoácido del péptido se modifica en un éster de alquilo. Esta modificación se puede producir, por ejemplo, mediante el tratamiento de un ácido carboxílico con un alcohol en presencia de un agente deshidratante, en donde el agente deshidratante puede incluir, pero no se limita a, un ácido fuerte, tal como ácido sulfúrico. Otros métodos para producir ésteres de alquilo a partir de grupos carboxilo son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria un grupo carboxilo tiene la fórmula: (-COOH).

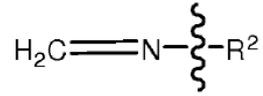
Como se emplea en la presente memoria, el término "alquilo", se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena saturada lineal o ramificada.

30 Como se emplea en la presente memoria, un grupo es terminal o final cuando el grupo se presenta en el extremo de la secuencia aminoácida.

Como se emplea en la presente memoria, un grupo amino en un péptido tiene la fórmula:



, en donde R² es el resto del péptido.



Como se emplea en la presente memoria, un grupo imina en un péptido tiene la fórmula: $\text{H}_2\text{C}=\text{N}-\text{R}^2$, en donde R^2 es el resto del péptido.

En algunas realizaciones, el ácido carboxílico de la cadena lateral de un aminoácido de glutamato en una secuencia peptídica se modifica en un éster de alquilo.

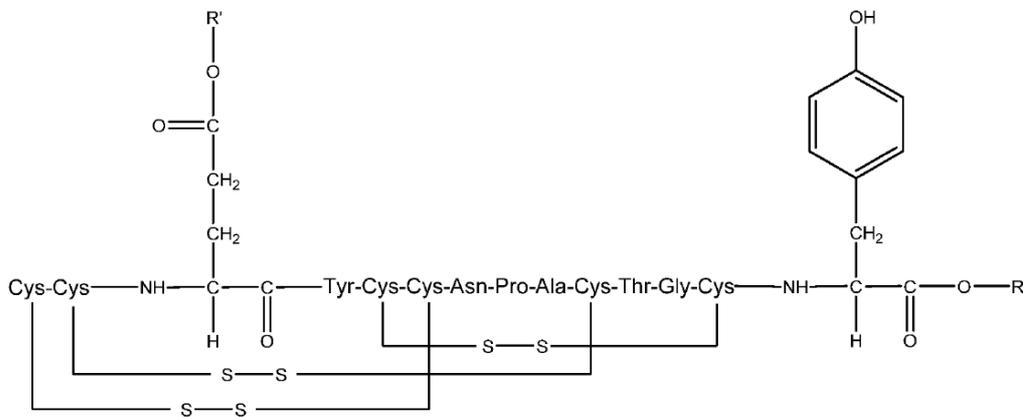
- 5 En otras realizaciones, el ácido carboxílico de la cadena lateral de un aminoácido glutamato en una secuencia peptídica se modifica en éster de etilo.

En otras realizaciones, el ácido carboxílico C-terminal de un aminoácido de tirosina en una secuencia peptídica se modifica en un éster de alquilo.

- 10 En otras realizaciones, el ácido carboxílico C-terminal de un aminoácido de tirosina en una secuencia peptídica se modifica en un éster de etilo.

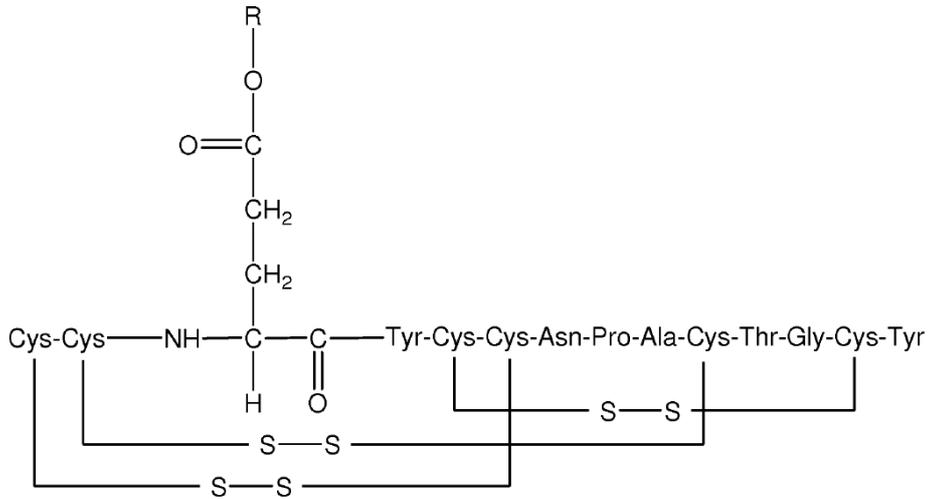
En varias realizaciones, la presente divulgación proporciona un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende la secuencia aminoácida Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr, en donde al menos un grupo carboxilo del péptido es un éster de alquilo que tiene la fórmula (-COOR) en el que R es un alquilo de C_{1-6} .

- 15 En varias realizaciones, el péptido comprende una estructura aminoácida de:



o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde R' es H o un alquilo de C_{1-6} , y al menos un R' es un alquilo de C_{1-6} .

- 20 En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende un péptido que tiene una estructura aminoácida de:

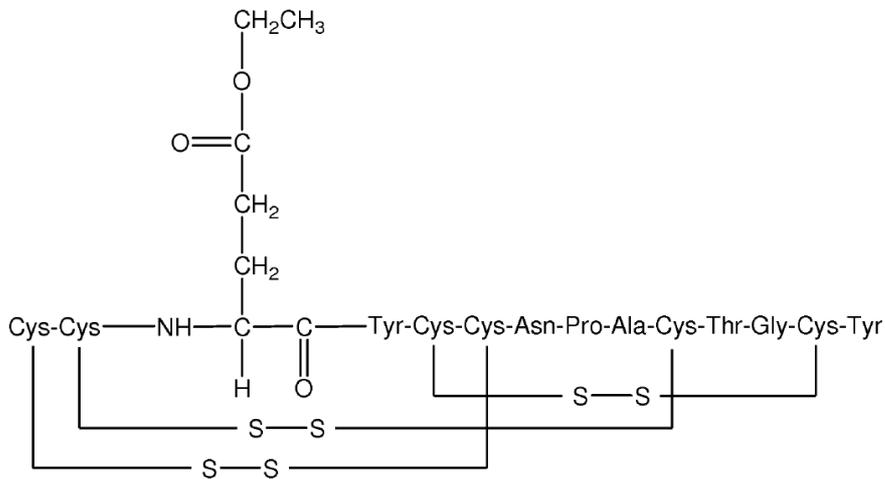


en donde R es un alquilo de C₁₋₆ ("Glu₃-éster de alquilo").

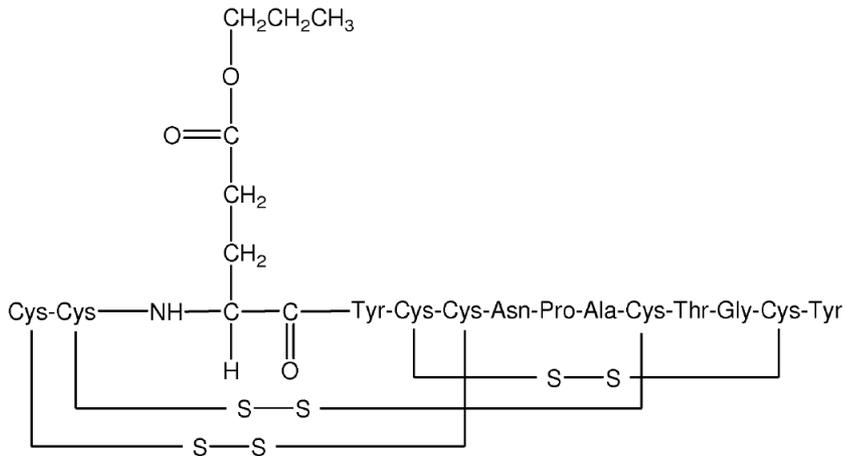
En otras realizaciones, R es un alquilo de C₁₋₄.

En otras realizaciones, R es metilo, etilo, o propilo.

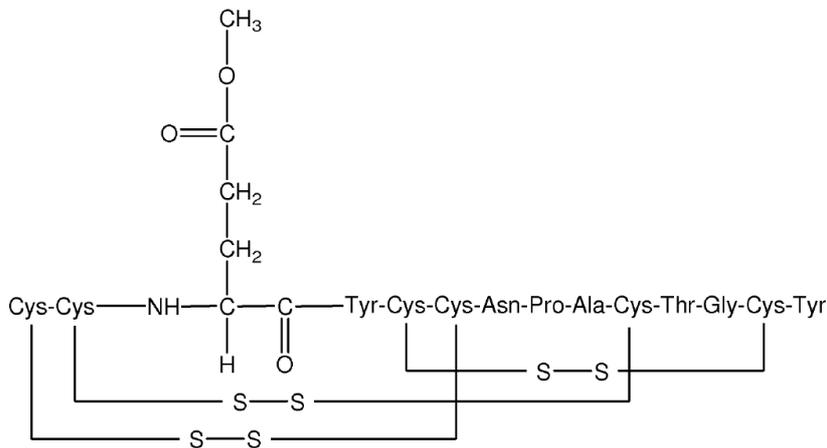
- 5 En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende una estructura aminoácida de ("Glu₃-éster de etilo):



En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende una estructura aminoácida de:

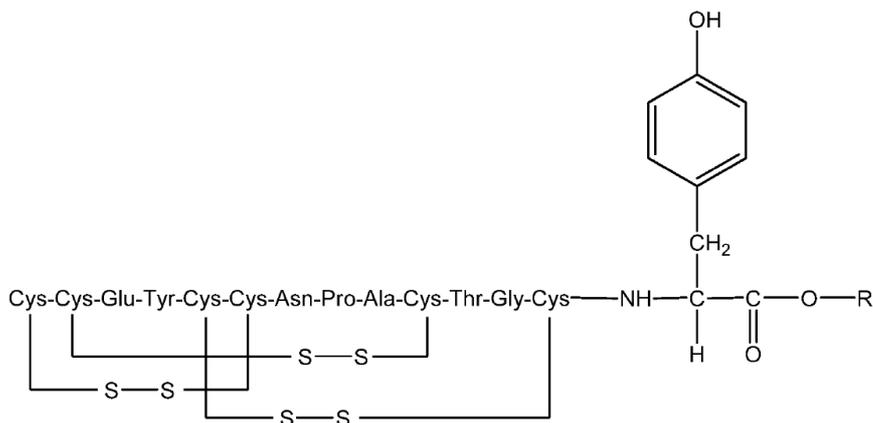


En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende una estructura aminoácida de:



- 5 En algunas realizaciones, la tirosina C-terminal del Glu₃-éster de alquilo o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, está ausente.

En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende una estructura aminoácida de:

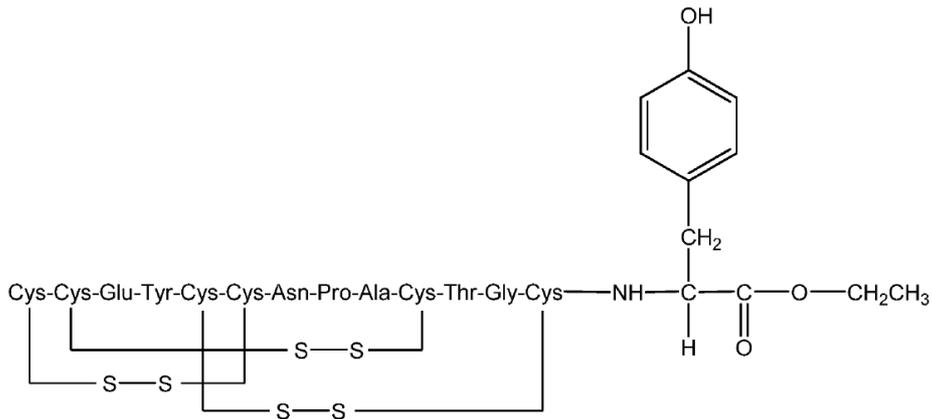


en donde R es un alquilo de C₁₋₆.

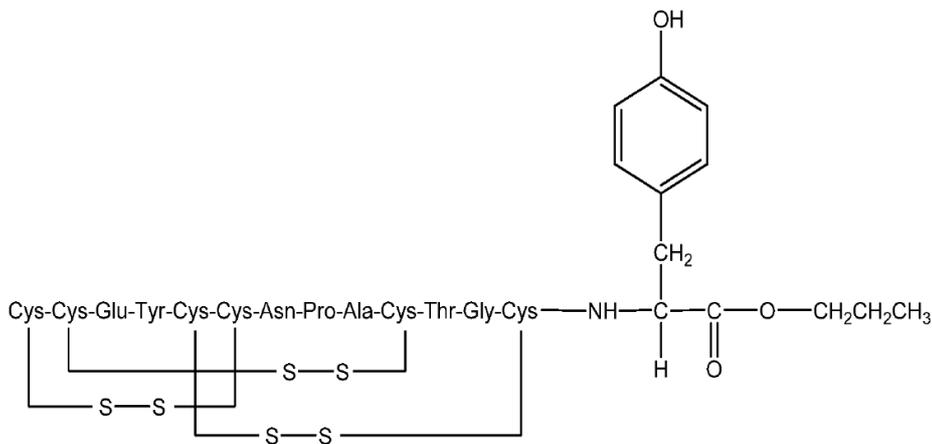
En otras realizaciones, R es un alquilo de C₁₋₄.

En otras realizaciones, R es metilo, etilo, o propilo.

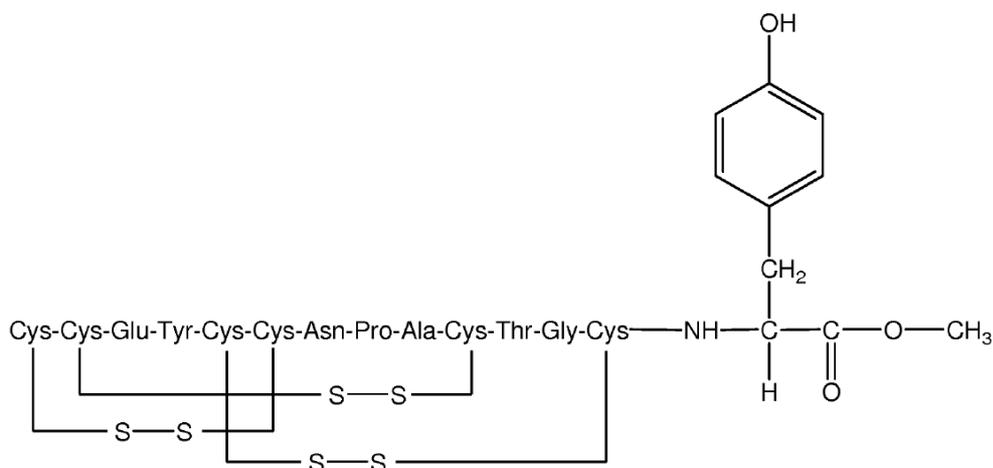
- 5 En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende una estructura aminoácida de ("Tyr₁₄-éster de etilo"):



- En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende una estructura aminoácida de:



- 10 En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende una estructura aminoácida de:



5 Sin deseo de estar vinculado por ninguna teoría, se puede modificar un péptido en donde al menos un grupo amino de los restos aminoácidos del péptido se modifica en una imina. Esta modificación se puede producir, por ejemplo, mediante el tratamiento de un grupo amino con un carbonilo, tal como un aldehído o cetona, en presencia de un catalizador ácido. Otros métodos para producir iminas a partir de grupos amino son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, la modificación de la imina se puede producir mediante una reacción mediada por formaldehído en presencia del catalizador ácido.

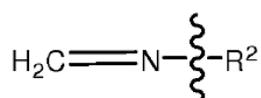
En otras realizaciones, el carbono de la imina se puede entrecruzar a otro grupo amino del péptido.

10 En otras realizaciones, un péptido se puede modificar en una imina en el grupo α-amino del aminoácido N-terminal, en donde el carbono de la imina se entrecruza con un grupo amino del segundo resto aminoácido del péptido, formando un anillo de cinco miembros.

15 En otras realizaciones, un péptido que comprende la secuencia aminoácida Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr se puede modificar con la adición de metileno en el grupo α-amino del Cys₁ N-terminal, que se entrecruza al grupo amino del Cys₂ para formar un anillo de imidazolidinona de 5 miembros en el N-terminal del péptido ("Cys₁-IMD").

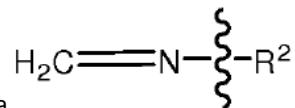
En un aspecto, la divulgación proporciona nuevos agonistas peptídicos GC-C útiles para el tratamiento de los trastornos gastrointestinales.

20 En varias realizaciones, la presente divulgación proporciona un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende la secuencia aminoácida Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr, en donde al menos un grupo amino del péptido es una imina que tiene la fórmula



, en donde R² es el resto del péptido.

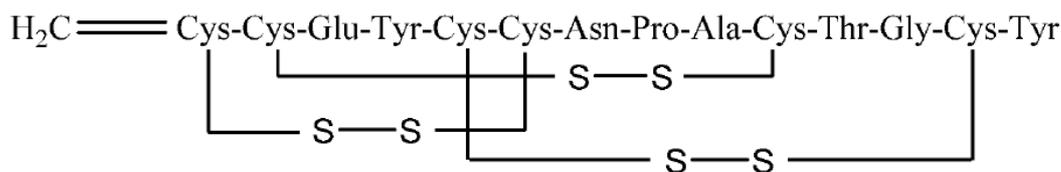
En algunas realizaciones, el péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende un péptido en



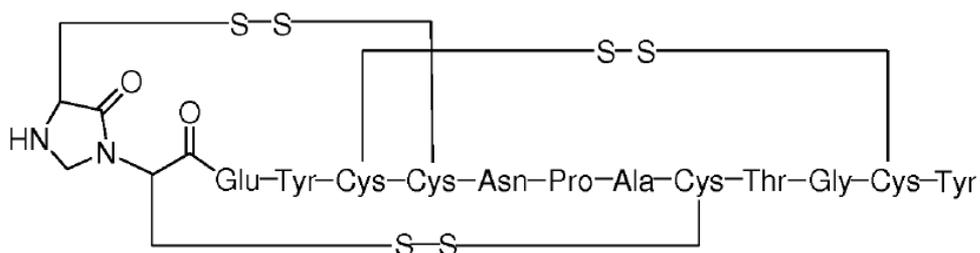
donde el grupo amino N-terminal del péptido es una imina que tiene la fórmula $\text{H}_2\text{C}=\text{N}-\text{R}^2$, en donde R^2 es el resto del péptido.

En otras realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende una estructura aminoácida de:

5



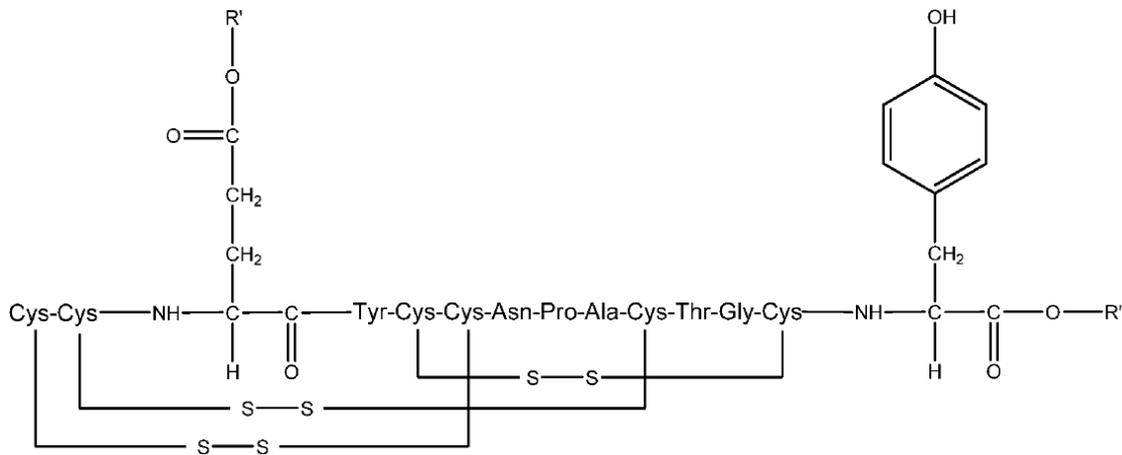
En varias realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende una estructura aminoácida de:



10 En algunas realizaciones, la tirosina C-terminal del péptido Cys₁-IMD o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, está ausente. En algunas realizaciones, el péptido Cys₁-IMD o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende además una o más modificaciones péptidicas, en donde al menos un grupo carboxilo del péptido es un éster de alquilo que tiene la fórmula (-COOR) en la que R es un alquilo de C₁₋₆.

15 En varias realizaciones, la presente divulgación proporciona un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido consiste de la secuencia aminoácida Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr, en donde al menos un grupo carboxilo del péptido es un éster de alquilo que tiene la fórmula (-COOR) en la que R es un alquilo de C₁₋₆.

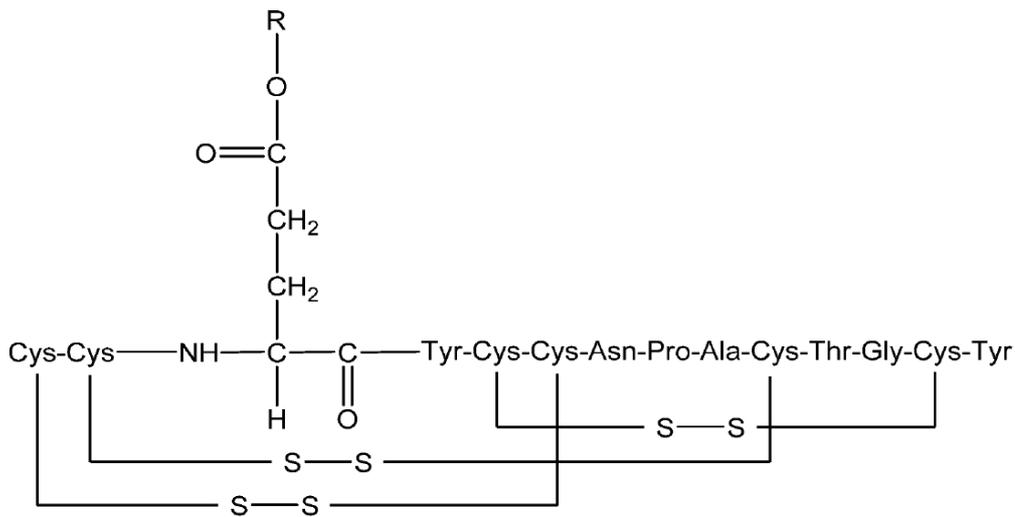
En varias realizaciones, el péptido consiste de una estructura aminoácida de:



, o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde R' es H o un alquilo de C₁₋₆, y al menos un R' es un alquilo de C₁₋₆.

En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste de una estructura aminoácida de:

5

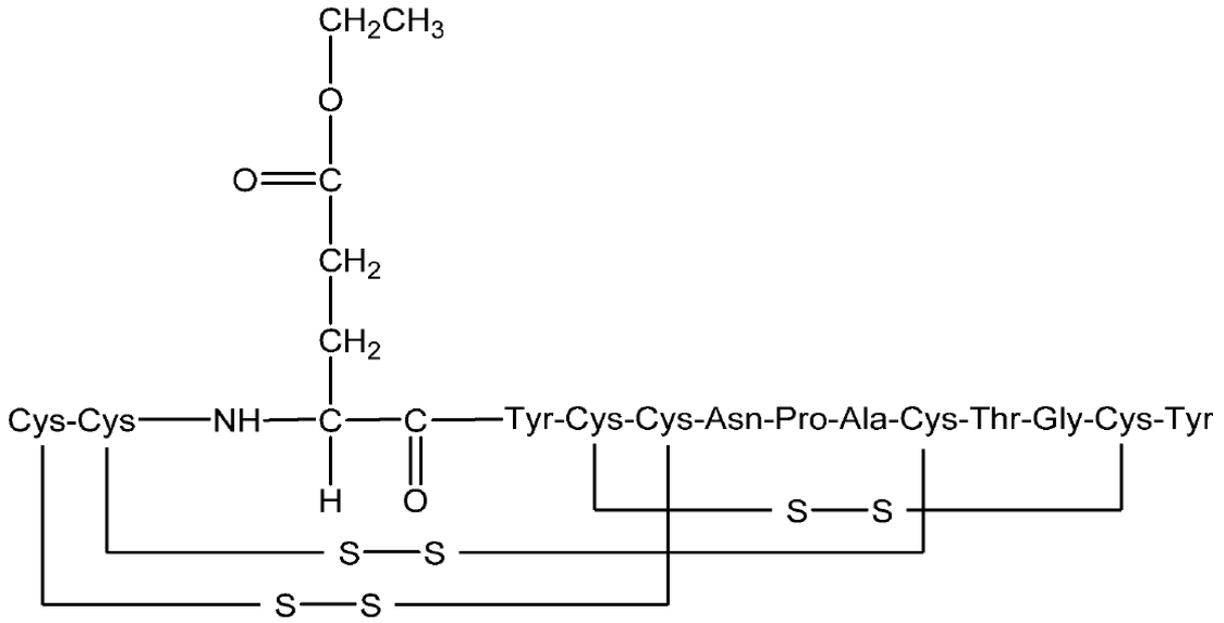


en donde R es un alquilo de C₁₋₆. En otras realizaciones, la tirosina C-terminal está ausente.

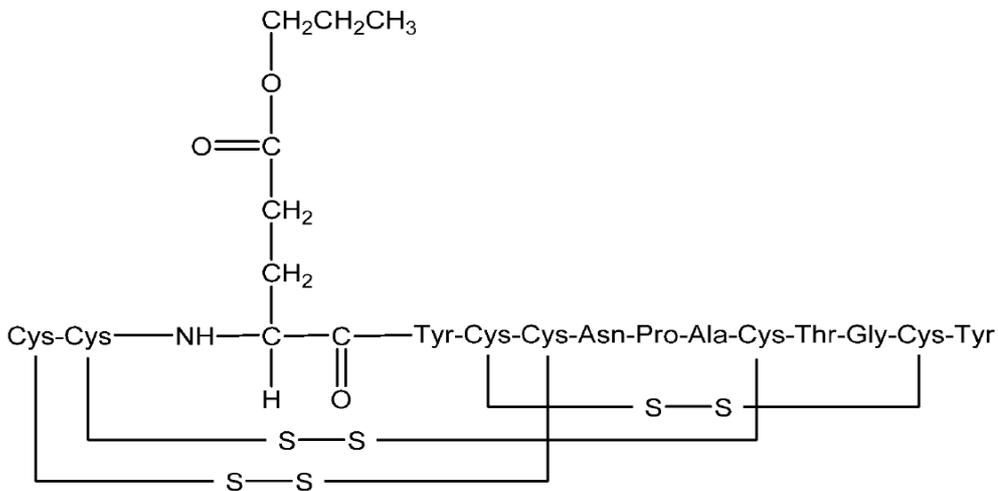
En otras realizaciones, R es un alquilo de C₁₋₄.

En otras realizaciones, R es metilo, etilo, o propilo.

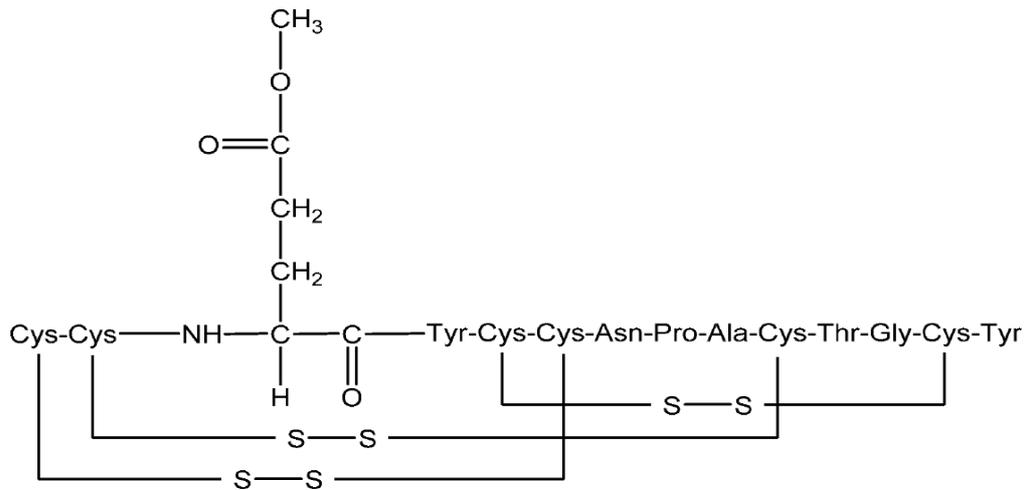
10 En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste en un péptido que tiene una estructura aminoácida de:



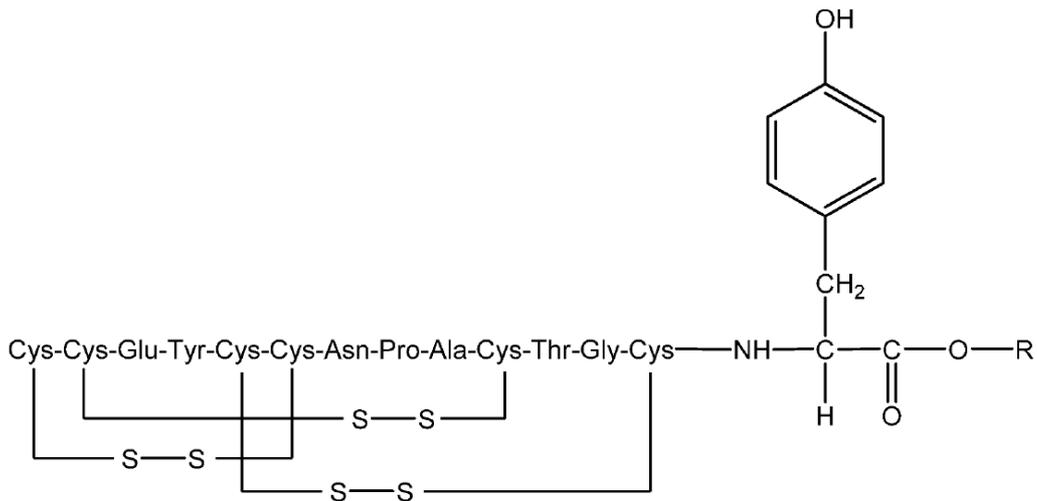
En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste en un péptido que tiene una estructura aminoácida de:



- 5 En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste en un péptido que tiene una estructura aminoácida de:



En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste en un péptido que tiene una estructura aminoácida de:

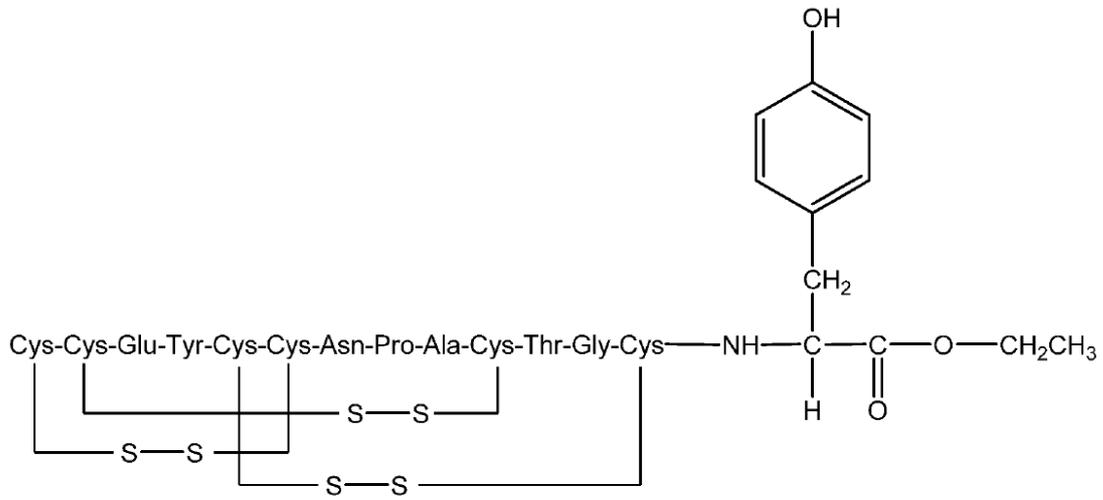


5 en donde R es un alquilo de C₁₋₆.

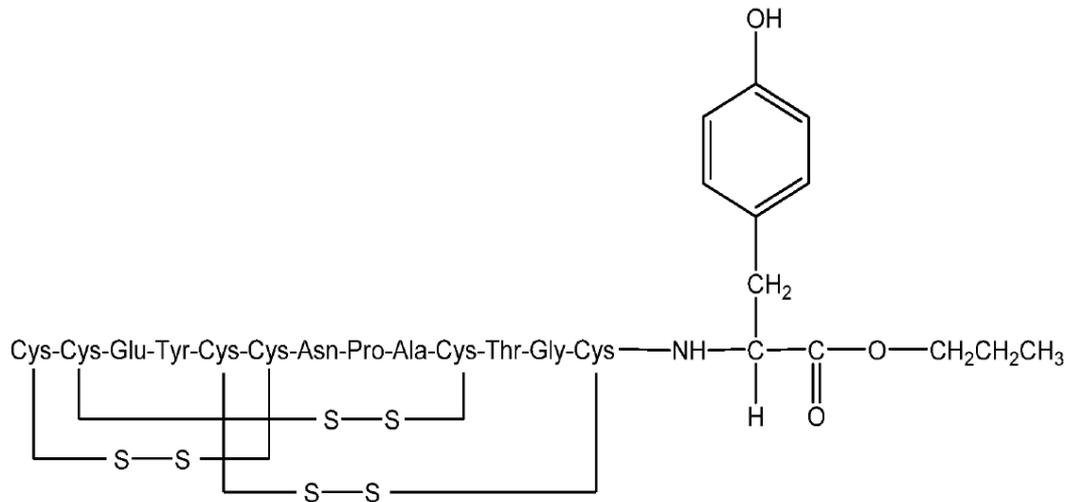
En otras realizaciones, R es un alquilo de C₁₋₄.

En otras realizaciones, R es metilo, etilo, o propilo.

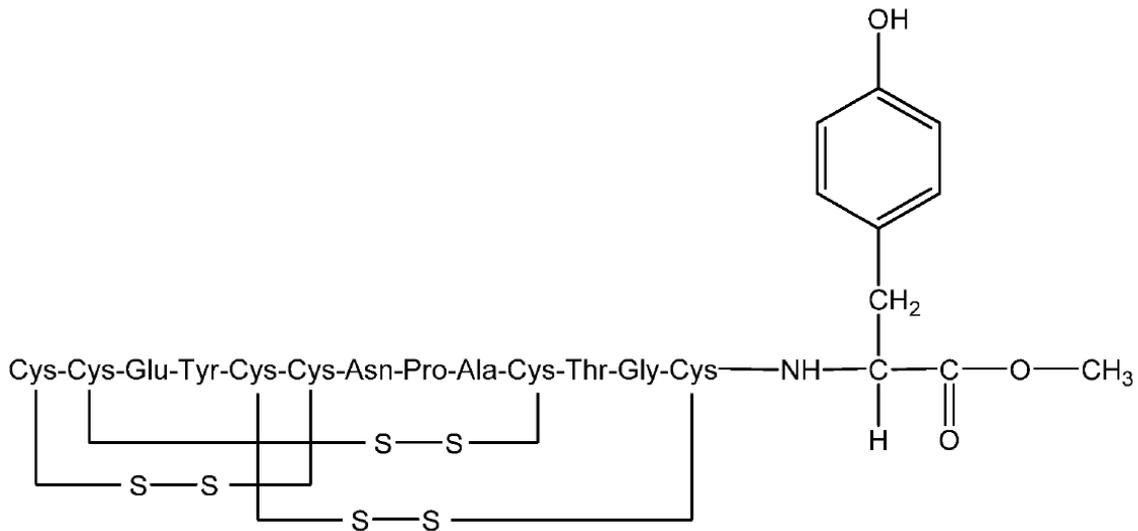
En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste en una estructura aminoácida de:



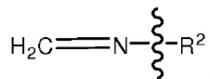
En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste en una estructura aminoácida de:



- 5 En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste en una estructura aminoácida de:



En varias realizaciones, la presente divulgación proporciona un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido consiste en una secuencia aminoácida Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr, en donde al menos un grupo amino del péptido es una imina que tiene la fórmula



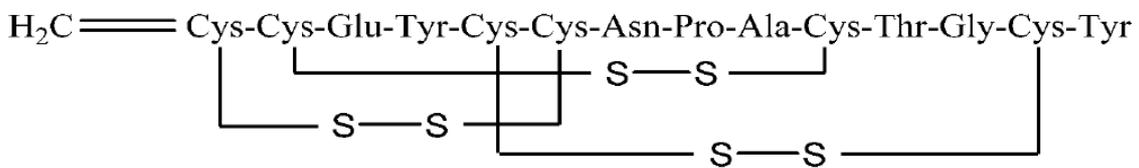
5 , en donde R² es el resto del péptido.

En algunas realizaciones, el péptido o una sal aceptable farmacéuticamente consiste en un péptido en donde el

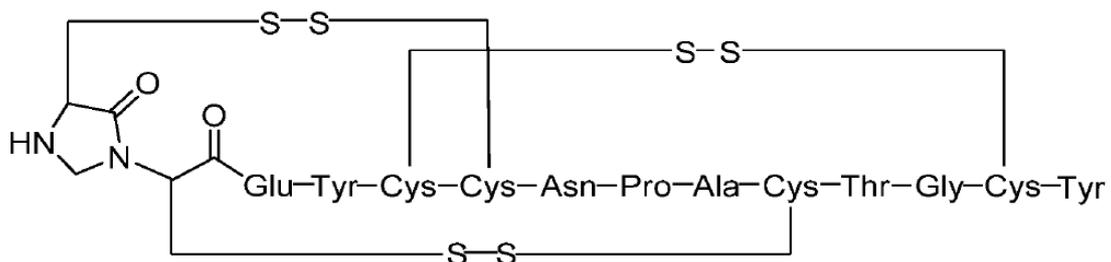
grupo amino N-terminal del péptido es una imina que tiene la fórmula $\text{H}_2\text{C}=\text{N}-\text{R}^2$, en donde R² es el resto del péptido.

En otras realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste en una estructura aminoácida de:

10



En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente consiste en un péptido que tiene una estructura aminoácida de:



En algunas realizaciones, la tirosina C-terminal del péptido Cys₁-IMD o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, está ausente. En algunas realizaciones, el péptido Cys₁-IMD o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, comprende además uno o más modificaciones peptídicas, por ejemplo, en donde al menos un grupo carboxilo del péptido es un éster de alquilo que tiene la fórmula (-COOR), en donde R es un alquilo de C₁₋₆.

- 5 En algunas realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente activa el receptor de guanilato ciclasa C.

En otras realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, comprende 30 aminoácidos o menos.

- 10 En otras realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, comprende 20 aminoácidos o menos.

En otras realizaciones, el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, comprende un péptido en donde menos de cinco aminoácidos preceden al primer resto Cys de la secuencia aminoácida.

En algunas realizaciones, se aísla el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente.

En otras realizaciones, se purifica el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente.

- 15 En algunas realizaciones, se proporciona una sal del péptido aceptable farmacéuticamente. En algunos casos, la sal aceptable farmacéuticamente es una sal de cloruro.

Péptidos variantes o modificados

En varias realizaciones, el péptido incluye dos Cys que forman un enlace disulfuro, el péptido incluye cuatro Cys que forman dos enlaces disulfuro, o el péptido incluye seis Cys que forman tres enlaces disulfuro.

- 20 En algunos pares peptídicos de los restos Cys que forman normalmente un enlace disulfuro uno o ambos miembros del par se pueden reemplazar por homocisteína, penicilamina, 3-mercaptoprolina (Kolodziej et al. 1996 *Int J Pept Protein Res* 48:274); β,β dimetilcisteína (Hunt et al. 1993 *Int J Pept Protein Res* 42:249) o ácido diaminopropiónico (Smith et al. 1978 *J Med Chem* 21:117) para formar entrecruzamientos internos alternativos en las posiciones de los enlaces disulfuro normales. En otras realizaciones, los enlaces disulfuro se pueden reemplazar por hidrocarburo entrecruzado (Schafmeister et al. 2000 *J Am Chem Soc* 122:5891, Patgiri et al. 2008 *Acc Chem Res* 41:1289, Henchey et al. 2008 *Curr Opin Chem Biol* 12:692).
- 25

Producción de péptidos

En una realización, los péptidos o péptidos precursores de la divulgación se pueden producir de manera recombinante en cualquiera de los sistemas de expresión proteica conocidos, incluyendo, sin limitación, bacterias (por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus subtilis*), sistemas celulares de insectos (por ejemplo, sistemas celulares de *Drosophila Sf9*), sistemas celulares de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. Saccharomyces*) o sistemas de expresión de hongos filamentosos, o sistemas de expresión de células de animales (por ejemplo, sistemas de expresión de células de mamíferos). Los péptidos o péptidos precursores en la divulgación se pueden sintetizar también químicamente.

30

- 35 Si el péptido o variante del péptido se produce de manera recombinante, por ejemplo, *E. coli*, la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido puede codificar también una secuencia líder que permite la secreción del péptido maduro a partir de la célula. Por tanto, la secuencia que codifica el péptido puede incluir la pre secuencia y la pro

secuencia de, por ejemplo, un péptido ST bacteriano que aparece de forma natural. El péptido maduro secretado se puede purificar a partir del medio de cultivo.

La secuencia que codifica un péptido descrito en la presente memoria se puede insertar en un vector capaz de repartir y mantener la molécula de ácido nucleico en una célula bacteriana. La molécula de ADN se puede insertar en un vector que se replica de manera autónoma (vectores adecuados incluyen, por ejemplo, pGEM3Z y pcADN3, y derivados de los mismos). El ácido nucleico vector puede ser un ADN bacteriano o bacteriófago, tal como el bacteriófago lambda o M13 y derivados de los mismos. La construcción de un vector que contiene un ácido nucleico descrito en la presente memoria puede continuarse mediante la transformación de una célula huésped, tal como una bacteria. Huéspedes bacterianos adecuados incluyen pero no se limitan a, *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas* y *Salmonella*. La construcción genética incluye también, 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 la iniciación transcripcional, tales como un promotor, potenciador, operador, y secuencias represoras. Son bien conocidas por los expertos en la técnica una gran variedad de secuencias de control transcripcional. El vector de expresión puede incluir también una secuencia reguladora de traducción (por ejemplo, una secuencia 5' no traducida, una secuencia 3' no traducida, o un sitio interno de entrada al ribosoma). El vector puede ser capaz de replicarse de manera autónoma o se puede integrar en el ADN del huésped para garantizar o asegurar la estabilidad durante la producción del péptido.

Un péptido descrito en la presente memoria que incluye la secuencia codificante de la proteína, se puede fusionar a un ácido nucleico que codifica un marcador peptídico afín, por ejemplo, glutatión S-transferasa (GST), proteína E de unión a maltosa, proteína A, marcador FLAG, hexahistidina, marcador myc o marcador HA de la gripe, para facilitar la purificación. El marcador de afinidad o marcador de fusión une el marco de lectura del péptido de interés al marco de lectura del gen que codifica el marcador de afinidad, tal que se genera la fusión transduccional. La expresión del gen de fusión da como resultado la traducción de un solo péptido, que incluye tanto el péptido de interés, como el marcador de afinidad. En algunos casos, cuando se utilizan los marcadores de afinidad, la secuencia de ADN que codifica un sitio de reconocimiento de proteasa se fusionará entre los marcos de lectura del marcador de afinidad y el péptido de interés.

Las construcciones genéticas y métodos adecuados para la producción de las formas inmadura y madura de los péptidos y variantes descritos en la presente memoria, en los distintos sistemas de expresión proteica de la bacteria, son bien conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden emplear para producir péptidos en un sistema biológico.

En otras realizaciones, los péptidos que contienen aminoácidos no se incorporan generalmente mediante la maquinaria de traducción que se describen anteriormente (por ejemplo, β -Asp carboxilado, y Glu carboxilado, Asu, Aad y Apm) se pueden producir de manera recombinante mediante métodos de modificación de ARNt. Los métodos para modificar el ARNt incluyen, pero no se limitan a, modificar el anti-codon, el sitio de unión al aminoácido, y/o el sistema aceptor, para permitir la incorporación de aminoácidos no naturales y/o arbitrarios, y son bien conocidos en la técnica (*Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2008) 372:480-485; *Chem Biol.* (2009) 16:323-36; *Nat. Methods* (2007) 4:239-44; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2006) 7:775-82; *Methods* (2005) 36:227-238; *Methods* (2005) 36:270-278; *Annu. Rev. Biochem.* (2004) 73:147-176; *Nuc. Acids Res.* (2004) 32:6200-6211; *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (2003) 100:6353-6357; *Royal Soc. Chem.* (2004) 33:422-430).

En algunas realizaciones, los péptidos se pueden producir químicamente. Los péptidos se pueden sintetizar mediante una gran cantidad de métodos, incluyendo la disolución y la síntesis en fase sólida empleando la

protección BOC o Fmoc tradicional. Por ejemplo, el péptido se puede sintetizar en resina 2-clorotritil o resina Wang empleando emparejamientos de aminoácidos consecutivos. Se pueden emplear los siguientes grupos de protección: Fluorenilmetiloxycarbonilo o *terc*-butiloxycarbonilo (grupos alfa-amino, N-terminales); tritil o *terc*-butil (grupos tiol de Cys); *terc*-butil (γ -carboxilo del ácido glutámico y el grupo hidroxilo de treonina, si se presentan); y tritil (cadena lateral de asparragina de función β -amida y el grupo fenólico de tirosina, si se presenta). El acoplamiento se puede efectuar con DIC (N,N'-Diisopropilcarbodiimida) y HOBt (Hidroxibenzo triazol) en presencia de una amina terciaria, y el péptido se puede desproteger y separar del soporte sólido usando cóctel K (ácido trifluoroacético 81%, fenol 5%, tioanisol 5%, 1,2-etanoditiol 2,5%, agua 3%, dimetilsulfuro 2%, yoduro de amonio 1,5% p/p). Después de eliminar el ácido trifluoroacético y otros volátiles, el péptido se puede precipitar usando un disolvente orgánico. Los enlaces disulfuro entre los residuos Cys, se pueden formar usando sulfóxido de dimetilo (Tam et al. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113:6657-62) o empleando una estrategia de oxidación al aire. El péptido resultante se puede purificar mediante cromatografía en fase inversa, y liofilizarse.

Estos péptidos se pueden fabricar, aislar o emplear, en forma de base o como sales de las mismas aceptables farmacéuticamente. Ejemplos de sales incluyen, sin limitación, sales de acetato, cloruro, sulfato y fosfato del péptido.

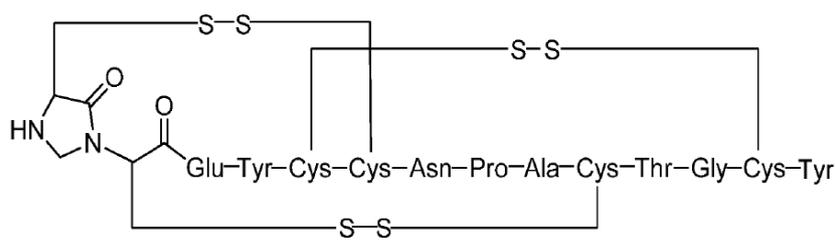
15 Composiciones de péptidos y agonistas del receptor GC-C

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan composiciones farmacéuticas en donde los péptidos, solos o en combinación, se pueden combinar con cualquier vehículo o medio aceptable farmacéuticamente.

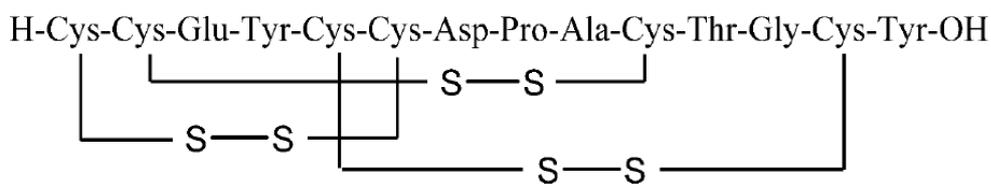
En varias realizaciones, la composición farmacéutica comprende un péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, como se describe en la presente memoria. La composición farmacéutica puede comprender dos o más péptidos o sales de los mismos aceptables farmacéuticamente descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende dos o más péptidos seleccionados de:

- i. un péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende la estructura aminoácida de:

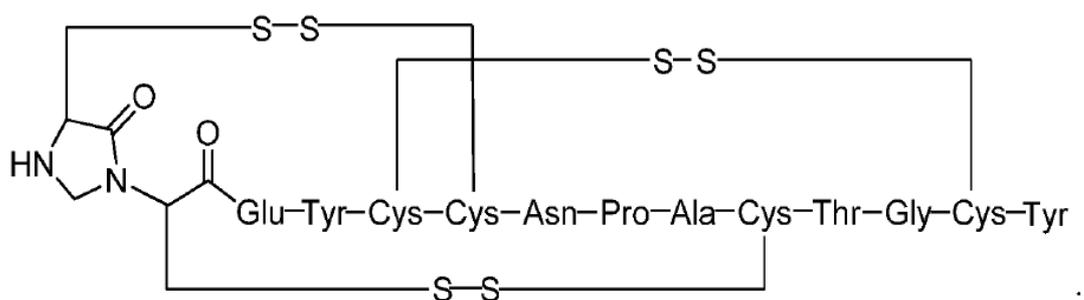


- ii. un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende una estructura aminoácida de:



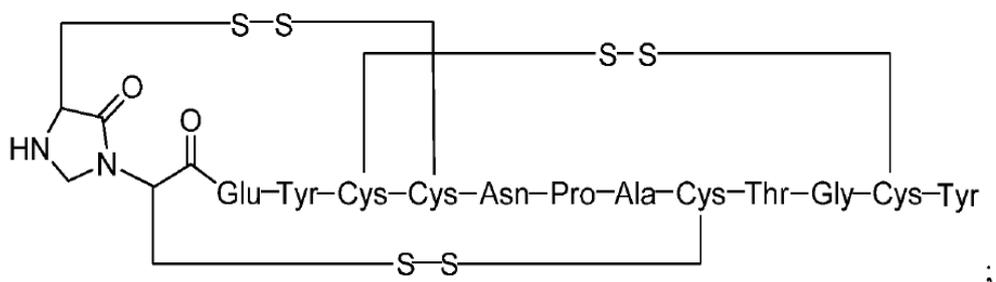
iii. un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende la secuencia aminoácida Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr, en donde al menos un grupo carboxilo del péptido es un éster de alquilo que tiene la fórmula (-COOR) en el que R es un alquilo de C₁₋₆.

5 En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende linaclotida y un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende una estructura aminoácida de:



y el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, comprende menos del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% en peso comparado con el peso de linaclotida.

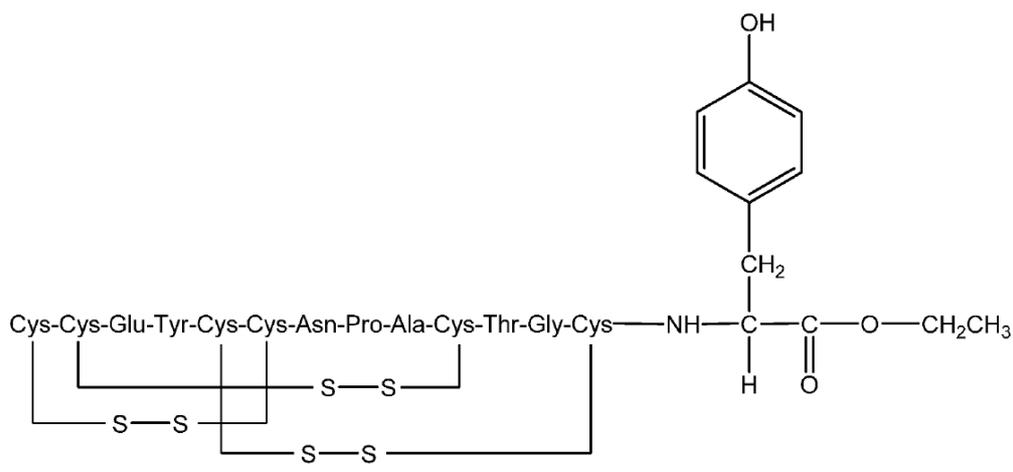
10 En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende linaclotida y un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende una estructura aminoácida de:



y el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende menos del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% en peso comparado con el peso de linaclotida.

15 En algunas realizaciones, el derivado imidazolidinona de la linaclotida comprende menos de aproximadamente 15% en peso de la composición, menos de aproximadamente 10% en peso de la composición, menos de 7% aproximadamente % en peso de la composición, o menos de aproximadamente 5% en peso de la composición. En otros ejemplos de realizaciones, el derivado imidazolidinona de linaclotida comprende de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 15% en peso de la composición, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 10% en peso de la composición, a aproximadamente 0,05% a aproximadamente 7% en peso de la composición, o aproximadamente 20 0,05% a aproximadamente 5% en peso de la composición.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende linaclotida y un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende una estructura aminoácida de:

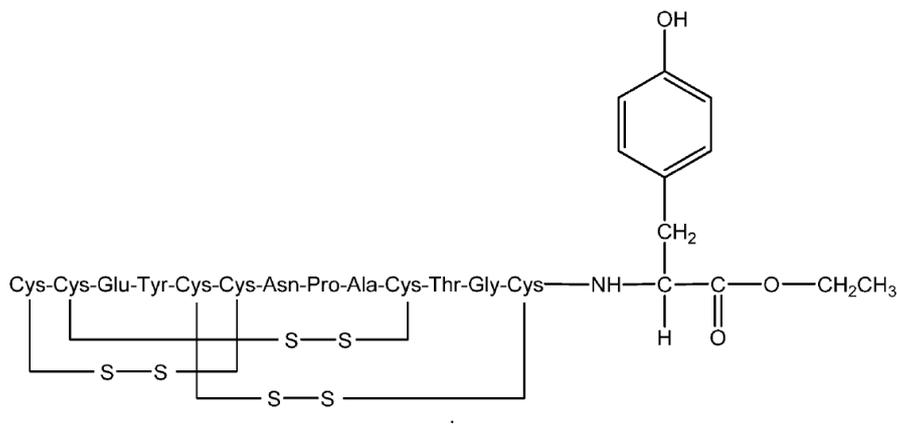


y el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende menos del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% en peso comparado con el peso de linaclotida.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende linaclotida y un péptido o una sal del mismo

5

aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende una estructura aminoácida de:



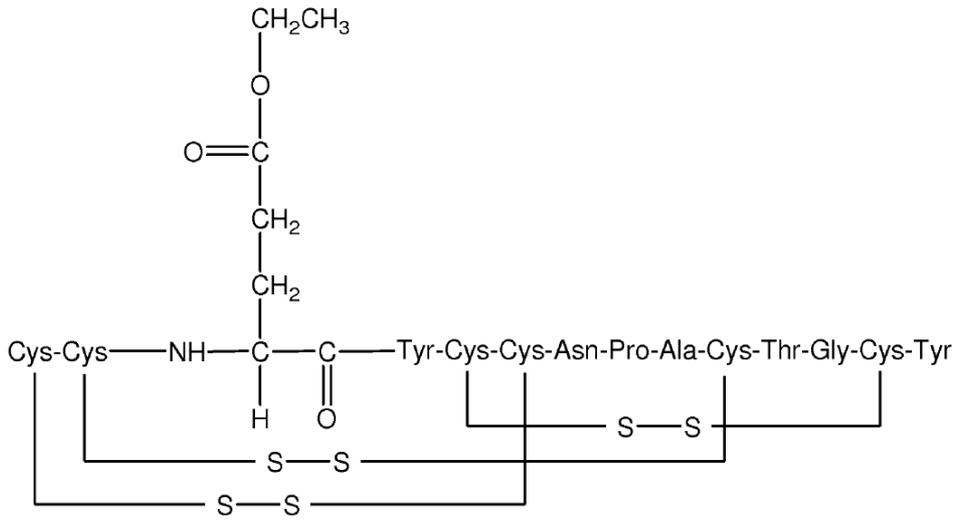
y el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende menos del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% en peso comparado con el peso de linaclotida.

10

En algunas realizaciones, el péptido Tyr₁₄-éster de etilo comprende menos de aproximadamente 15% en peso de la composición, menos de aproximadamente 10% en peso de la composición, menos de aproximadamente 7% en peso de la composición, o menos de 5% en peso de la composición. En otros ejemplos de realizaciones, el péptido Tyr₁₄-éster de etilo comprende de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 15% en peso de la composición, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 10% en peso de la composición, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 7% en peso de la composición, o aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5% en peso de la

15

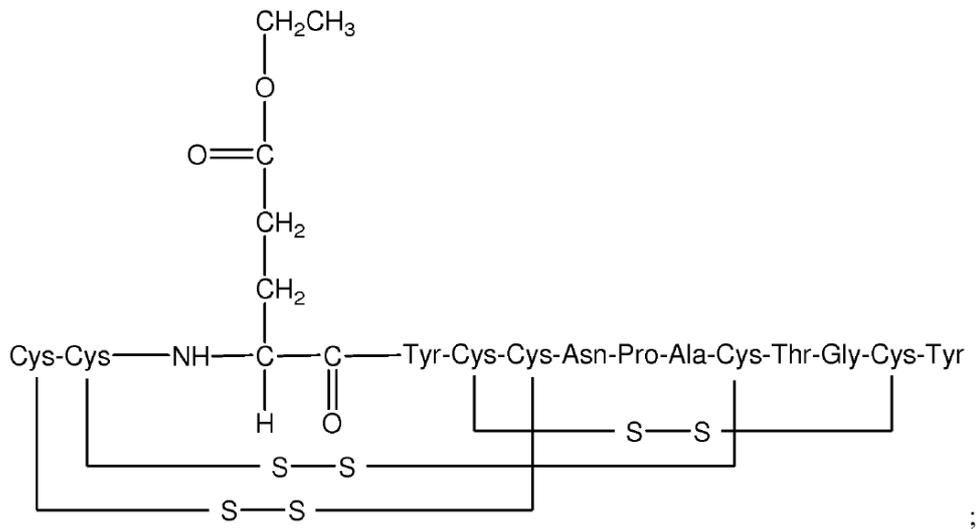
composición. En otras realizaciones, la composición farmacéutica que comprende linaclotida y un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende una estructura aminoácida de:



y el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende menos del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% en peso comparado con el peso de linaclotida.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende linaclotida y un péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende una estructura aminoácida de:

5

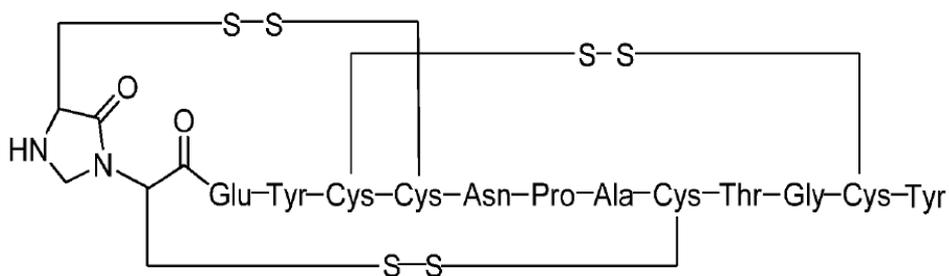


y el péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente comprende menos del 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% en peso comparado con el peso de linaclotida.

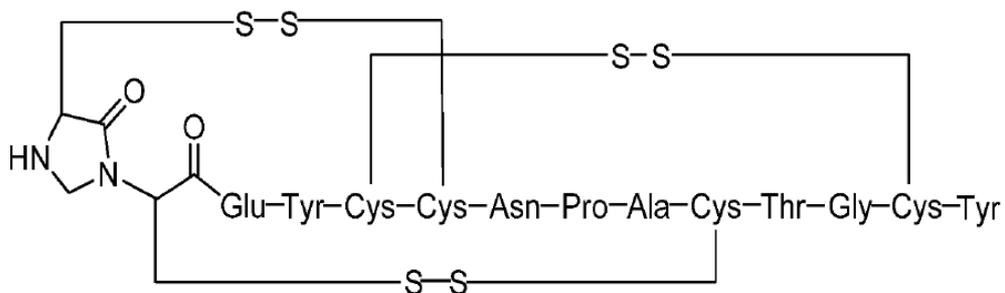
10 En algunas realizaciones, el péptido Glu₃-éster de etilo comprende menos de aproximadamente 15% en peso de la composición, menos de aproximadamente 10% en peso de la composición, menos de aproximadamente 7% en peso de la composición, o menos de aproximadamente 5% en peso de la composición. En otros ejemplos de realizaciones, el Glu₃-éster de etilo comprende de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 15% en peso de la composición, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 10% en peso de la composición, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 7% en peso de la composición, o aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5% en peso de la composición.

15

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un péptido o sal aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido consiste de la estructura aminoácida de:



5 En otras realizaciones, la composición farmacéutica consiste esencialmente en un péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende la estructura aminoácida de:



10 El término “que consiste esencialmente en” y variantes del mismo, cuando se emplea para referirse a la composición, se emplean en la presente memoria para indicar que la composición incluye un único péptido activo y otros aditivos inactivos farmacéuticamente deseados, excipientes, y/o componentes (por ejemplo, polímeros, aminas primarias impedidas estéricamente, cationes, agentes de relleno, aglutinantes, transportadores, excipientes, diluyentes, aditivos desintegrantes, lubricantes, disolventes, dispersantes, aditivos de recubrimiento, aditivos que promueven la absorción, aditivos de liberación controlada, aditivos anti-apelmazantes, aditivos anti-microbianos, conservadores, aditivos endulzantes, colorantes, saborizantes, desecantes, plastificantes, tintes, o similares), u otro ingrediente o ingredientes no activos farmacéuticamente.

15 Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden combinar con cualquier vehículo o medio tolerable farmacéuticamente, por ejemplo, disolventes, dispersantes, recubrimientos, agentes que promueven la absorción, agentes de liberación controlada, y uno o más excipientes inertes (que incluyen almidones, polioles, agentes granulados, celulosa microcristalina (por ejemplo, celphere, perlas Celphere®), diluyentes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes, y similares), etc. Si se desea, las dosificaciones de los comprimidos de las composiciones
20 divulgadas, se pueden recubrir mediante técnicas acuosas o no acuosas estándar.

Ejemplos de excipientes para emplear como vehículos aceptables farmacéuticamente y los vehículos inertes aceptables farmacéuticamente y los ingredientes adicionales anteriormente mencionados incluyen, pero no se limitan a, aglutinantes, rellenos, desintegrantes, lubricantes, agentes anti-microbianos, y agentes de recubrimiento.

25 Como se emplea en la presente memoria, el término “aglutinante” se refiere a cualquier aglutinante aceptable farmacéuticamente que se puede usar en la práctica de la divulgación. Ejemplos de aglutinantes aceptables

farmacéuticamente incluyen, sin limitación, un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata y almidón pre-gelatinizado (por ejemplo, STARCH 1500® y STARCH 1500 LM®, en venta en Colorcon, Ltd.) y otros almidones), maltodextrina, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como goma de acacia, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietil celulosa, hidroxietil metilcelulosa, hidroxipropil celulosa e hidroxipropil metilcelulosa (hipromelosa), etil celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa de calcio, carboximetil celulosa de sodio, carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina (por ejemplo, AVICEL™, tales como, AVICEL-PH-101™, -103™ y -105™, en venta en FMC Corporation, Marcus Hook, PA, EE.UU.)), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona (por ejemplo, polivinil pirrolidona K30), y mezclas de los mismos.

Como se emplea en la presente memoria, el término “rellenador” se refiere a cualquier relleno aceptable farmacéuticamente que se puede emplear en la práctica de la divulgación. Ejemplos de rellenos aceptables farmacéuticamente, incluyen, sin limitación, talco, carbonato cálcico (por ejemplo, gránulos o polvo), fosfato cálcico dibásico, fosfato cálcico tribásico, sulfato cálcico (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina (por ejemplo, Avicel PH101 o Celphere CP-305), celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón (por ejemplo, Almidón 1500), almidón pre-gelatinizado, lactosa, glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, rafinosa, maltitol, melecitosa, estaquiosa, lactitol, palatinito, xilitol, mioinositol, y mezclas de los mismo.

Ejemplos de rellenos aceptables farmacéuticamente que se pueden emplear particularmente para recubrir los péptidos incluyen, sin limitación, talco, celulosa microcristalina (por ejemplo, Avicel PH101 o Celphere CP-305) celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pre-gelatinizado, lactosa, glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, fosfato cálcico dibásico, rafinosa, maltitol, melecitosa, estaquiosa, lactitol, palatinito, xilitol, manitol, mioinositol, y mezclas de los mismos.

Como se emplea en la presente memoria, el término “aditivos” se refiere a cualquier aditivo aceptable farmacéuticamente. Aditivos aceptables farmacéuticamente incluyen, sin limitación, desintegrantes, aditivos dispersantes, lubricantes, deslizantes, antioxidantes, aditivos de recubrimiento, diluyentes, tensioactivos, aditivos saborizantes, humectantes, aditivos que promueven la absorción, aditivos de liberación controlada, aditivos anti-apelmazantes, agentes anti-microbianos (por ejemplo, conservadores), colorantes, desecantes, plastificantes y tintes. Como se emplea en la presente memoria, un “excipiente” es cualquier aditivo, relleno, aglutinante o agente aceptable farmacéuticamente.

Las composiciones de la presente divulgación pueden incluir también opcionalmente otros ingredientes terapéuticos, agentes anti-apelmazantes, conservadores, agentes endulzantes, colorantes, saborizantes, desecantes, plastificantes, tintes, deslizantes, anti-adherentes, agentes anti-estáticos, tensioactivos (agentes humectantes), antioxidantes, agentes de recubrimiento en película, y similares. Cualquier ingrediente opcional debe ser compatible con el compuesto descrito en la presente memoria para asegurar la estabilidad de la formulación. La composición puede contener otros aditivos cuando sea necesario, incluyendo, por ejemplo, lactosa, glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, maltitol, melecitosa, estaquiosa, lactitol, palatinito, almidón, xilitol, manitol, mioinositol, y similares, e hidratos de los mismos, y aminoácidos, por ejemplo, alanina, glicina y betaína, y péptidos y proteínas, por ejemplo, albumen.

Las composiciones pueden incluir, por ejemplo, varios disolventes adicionales, dispersantes, recubrimientos, aditivos que promueven la absorción, aditivos de liberación controlada y uno o más aditivos inertes (los cuales incluyen, por ejemplo, almidones, polioles, aditivos granulados, celulosa microcristalina, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, aditivos desintegrantes, y similares), etc. Si se desea, las dosificaciones de los comprimidos de las composiciones

divulgadas se pueden recubrir mediante técnicas acuosas o no-acuosas estándar. Las composiciones pueden incluir también, por ejemplo, aditivos anti-apelmazantes, conservadores, aditivos endulzantes, colorantes, saborizantes, desecantes, plastificantes, tintes, y similares.

5 Desintegrantes adecuados incluyen, por ejemplo, agar-agar, carbonato cálcico, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, povidona, polacrilin potásico, glicolato sódico de almidón, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pre-gelatinizado, arcillas, otros alginatos, otras celulosas, gomas, y mezclas de los mismos.

10 Lubricantes adecuados incluyen, por ejemplo, estearato cálcico, estearato magnésico, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, gel silica syloid (AEROSIL 200, W.R. Grace Co., Baltimore, MD EE.UU.), un aerosol coagulado de silica sintética (Evonik Degussa Co., Plano, TX EE.UU.), un dióxido de silicón pirogénico (CAB-O-SIL, Cabot Co., Boston, MA EE.UU.), y mezclas de los mismos.

15 Deslizantes adecuados incluyen, por ejemplo, leucina, dióxido de silicón coloidal, trisilicato magnésico, celulosa en polvo, almidón, talco, y fosfato cálcico tribásico.

Aditivos anti-apelmazante adecuados incluyen, por ejemplo, silicato cálcico, silicato magnésico, dióxido de silicón, dióxido de silicón coloidal, talco, y mezclas de los mismos.

20 Aditivos anti-microbianos adecuados que pueden usarse, por ejemplo, como un conservador de las composiciones peptídicas, incluyen, por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, butil parabeno, cloruro cetilpiridinio, cresol, clorobutanol, ácido dehidroacético, etilparabeno, metilparabeno, fenol, alcohol feniletílico, fenoxietanol, acetato de fenilmercurio, nitrato de fenilmercurio, sorbato potásico, propilparabeno, benzoato sódico, dehidroacetato sódico, propionato sódico, ácido sórbico, timerosal, timo, y mezclas de los mismos.

25 Antioxidantes adecuados incluyen, por ejemplo, BHA (hidroxianisól butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), vitamina E, galato de propilo, ácido ascórbico y sales o ésteres de los mismos, tocoferol y ésteres de los mismos, ácido alfa – lipoico y beta-caroteno.

30 Aditivos de recubrimiento adecuados incluyen, por ejemplo, carboximetil celulosa sódica, ftalato acetato de celulosa, etilcelulosa, gelatina, barniz farmacéutico, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa ftalato, metil celulosa, polietilenglicol, acetato polivinílico ftalato, shellac, sacarosa, dióxido de titanio, cera de carnauba, cera microcristalina, y mezclas de los mismos. Recubrimientos protectores adecuados incluyen Aquacoat (por ejemplo, Dispersión Acuosa Aquacoat de Etilcelulosa, 15% p/p, Biopolímero FMP, ECD-30), Eudragit (por ejemplo, Eudragit E PO PE-EL, Roehm Pharma Polymers) y Opadry (por ejemplo, dispersión AMB Opadry, 20% p/p, Colorcon).

35 En determinadas realizaciones, aditivos adecuados para la composición de péptidos incluyen uno o más de sacarosa, talco, estearato magnésico, crospovidona o BHA.

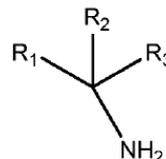
Las composiciones de la presente divulgación pueden incluir también otros excipientes, agentes, y grupos de los mismos incluyendo pero no limitado a L-histidina, Pluronic®, Poloxamers (tal como Lutrol® y Poloxamer 188), ácido ascórbico, glutatión, potenciadores de la permeabilidad (por ejemplo, lípidos, colato sódico, acilcarnitina, salicilatos, mezclas de sales biliares, micelas de ácidos grasos, quelantes, ácidos grasos, tensioactivos, glicéridos de cadena

media), inhibidores de la proteasa (por ejemplo, inhibidor de la tripsina de soja, ácidos orgánicos), agentes reductores del pH y potenciadores de la absorción eficaces para promover la biodisponibilidad (incluyendo pero no limitados a los descritos en US6086918 y US5912014), materiales para comprimidos masticables (como dextrosa, fructosa, lactosa monohidrato, 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 polivinilacetato); lubricantes en polvo (como behenato de glicerilo), cápsulas de gelatina blanda (como disolución especial de sorbitol); esferas de recubrimiento (como esferas de azúcar); agentes de esferificación (como behenato de glicerilo y celulosa microcristalina); agentes de suspensión/agentes gelificantes (como carragenina, goma gellan, manitol, celulosa microcristalina, povidona, glicolato de almidón sódico, goma xantana); edulcorantes (como aspartamo, aspartamo y lactosa, dextrosa, fructosa, miel, maltodextrina, maltosa, manitol, melaza, sorbitol cristalino, disolución especial de sorbitol, sacarosa); agentes de granulación húmeda (como carbonato cálcico, lactosa anhidra, lactosa monohidrato, maltodextrina, manitol, celulosa microcristalina, povidona, almidón), saborizantes (como caramelo, carboximetilcelulosa sódica, aroma de cereza y aroma de crema de cereza, ácido cítrico anhidro, ácido cítrico, azúcar de confitería, D&C Rojo N° 33, D&C Laca de Aluminio Amarillo N° 10, edetato disódico, alcohol etílico 15% FD&C laca de aluminio Amarillo N° 6, FD&C Azul N° 1, FD&C laca de aluminio Azul N° 2, FD&C Verde N° 3, FD&C Rojo N° 40, FD&C laca de aluminio Amarillo N° 6, FD&C Amarillo N° 6, FD&C Amarillo N° 10, palmitoestearato de glicerol, monoestearato de glicerilo, carmín índigo, lecitina, manitol, metil parabeno, y propil parabeno, glicirricinato monoamónico, saborizante de naranja natural y artificial, barniz farmacéutico, poloxamer 188, Polidextrosa, polisorbato 20, polisorbato 80, polividona, almidón de maíz pregelatinizado, almidón pregelatinizado, óxido de hierro rojo, sacarina sódica, carboximetil éter sódico, cloruro sódico, citrato sódico, fosfato sódico, saborizante de fresa, óxido de hierro negro sintético, óxido de hierro rojo sintético, dióxido de titanio, y cera blanca.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido descrito en la presente memoria y uno o más agentes que se seleccionan de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+ o Al^{3+} , una combinación de los mismos, y/o una amina primaria impedida estéricamente. En otras realizaciones, el agente es Mg^{2+} , Ca^{2+} o Zn^{2+} o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el catión se proporciona, sin limitación, como acetato de magnesio, cloruro de magnesio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, acetato cálcico, cloruro cálcico, fosfato cálcico, sulfato cálcico, acetato de zinc, cloruro de zinc, fosfato de zinc, sulfato de zinc, acetato de manganeso, cloruro de manganeso, fosfato de manganeso, sulfato de manganeso, acetato potásico, cloruro potásico, fosfato potásico, sulfato potásico, acetato sódico, cloruro sódico, fosfato sódico, sulfato sódico, acetato de aluminio, cloruro de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio. En otras realizaciones, el catión se proporciona como cloruro de magnesio, cloruro cálcico, fosfato cálcico, sulfato cálcico, acetato de zinc, cloruro de manganeso, cloruro potásico, cloruro sódico o cloruro de aluminio. En otras realizaciones, el catión se proporciona como cloruro cálcico, cloruro de magnesio o acetato de zinc.

En otra realización, el agente es una amina primaria impedida estéricamente. En otra realización, la amina primaria impedida estéricamente es un aminoácido. En otra realización, el aminoácido es un aminoácido que aparece de manera natural. En otra realización, el aminoácido que aparece de manera natural se selecciona del grupo que consiste en: histidina, fenilalanina, alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, leucina, metionina, asparragina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano, glicina y valina; aún más, el aminoácido que aparece de manera natural es leucina, isoleucina, alanina o metionina. En otra realización, el aminoácido que aparece de manera natural es leucina. En otra realización, la amina primaria impedida estéricamente es un aminoácido que aparece de manera no natural (por ejemplo, ácido 1-aminociclohexano carboxílico). En otra realización, la amina

primaria impedida estéricamente es ciclohexilamina, 2-metilbutilamina o chitosán. En otra realización, se pueden emplear en una composición una o más aminas primarias impedidas estéricamente.



En algunos casos, la amina primaria impedida estéricamente tiene la fórmula: $\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{NH}_2$, en donde, R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente a partir de: H,C(O)OH, alquilo de C1-C6, alquiléter de C1-C6, alquiltioéter de C1-C6, ácido carboxílico de alquilo de C1-C6, carboxilamida y alquilarilo de alquilo de C1-C6, en donde cualquier grupo se puede sustituir una o múltiples veces con: halógeno o amino, y siempre y cuando no más de R₁, R₂ y R₃ sean H. En otra realización, no más de un R₁, R₂ y R₃ es H.

En otras realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador aceptable farmacéuticamente, un péptido, un catión que se selecciona de Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, K⁺, Na⁺ o Al³⁺, o una mezcla de los mismos, y una amina primaria impedida estéricamente. En una realización, el catión es Mg²⁺, Ca²⁺ o Zn²⁺ o una mezcla de los mismos. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además un aglutinante aceptable farmacéuticamente y/o un deslizante aceptable farmacéuticamente, un lubricante o aditivo que actúa como un deslizante y lubricante y/o un antioxidante. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se aplica a un transportador. En algunas realizaciones, el transportador es un rellador.

En algunos casos la proporción molar de catión: amina primaria impedida estéricamente: péptido en la disolución acuosa que se aplica al transportador es 5-100:5-50:1. En algunos casos, la proporción molar del catión: amina primaria impedida estéricamente puede ser igual o mayor de 2:1 (por ejemplo, entre 5:1 y 2:1). Por tanto, en algunos casos la proporción molar de catión: amina primaria impedida estéricamente:péptido que se aplica al transportador es 100:50:1, 100:30:1, 80:40:1, 80:30:1, 80:20:1, 60:30:1, 60:20:1, 50:30:1, 50:20:1, 40:20:1, 20:20:1, 10:10:1, 10:5:1 ó 5:10:1. Cuando el aglutinante, por ejemplo, metilcelulosa está presente en la disolución peptídica agonista del GC-C que se aplica al transportador, se puede presentar en 0,5%-2,5% en peso (por ejemplo, 0,7% -1,7% o 0,7% -1% o 1,5% o 0,7%).

En otra realización, la composición farmacéutica comprende además un aglutinante o aditivo aceptable farmacéuticamente, y/o un deslizante aceptable farmacéuticamente, lubricante o aditivo que actúa tanto como un deslizante y lubricante y/o un antioxidante.

Composiciones farmacéuticas adecuadas de acuerdo con la divulgación incluirán generalmente una cantidad del compuesto o compuestos activos con un diluyente o excipiente aceptable farmacéuticamente, tal como, una disolución acuosa estéril, para proporcionar un intervalo final de concentraciones, que depende del uso intencionado. Las técnicas de preparación son generalmente bien conocidas en la técnica como se ejemplifican por Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª Edición, Mack Publishing Company, 1995).

Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden administrar sistémicamente o localmente, por ejemplo: oralmente (por ejemplo, empleando cápsulas, polvos, disoluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos sublinguales y similares), por inhalación (por ejemplo, con un aerosol, gas, inhalador, nebulizador o similares), para el oído (por ejemplo, empleando gotas óticas), tópicamente (por ejemplo, empleando cremas, geles, linimentos, lociones, pomadas, pastas, parches transdérmicos, etc), oftálmicamente (por ejemplo, con gotas oculares, geles oftálmicos, pomadas oftálmicas), rectalmente (por ejemplo, empleando enemas o supositorios), nasalmente, bucalmente, vaginalmente (por ejemplo, empleando duchas, dispositivos intrauterinos, supositorios

vaginales, anillos o comprimidos vaginales, etc), a través de un reservorio implantado o similar, o parenteralmente dependiendo de la gravedad y tipo de enfermedad que se está tratando. El término "parenteral" como se emplea en la presente memoria incluye, pero no se limita a, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

5 Preferiblemente, las composiciones son administradas oralmente, intraperitonealmente o intravenosamente.

Para tratamiento de los trastornos gastrointestinales, los péptidos descritos en la presente memoria se administran preferiblemente de manera oral, por ejemplo, como un comprimido, cápsula, un sobre que contiene una cantidad predeterminada de gránulos del ingrediente activo, gel, pasta, jarabe, bolo, electuario, papilla, polvo, polvo liofilizado, gránulos, como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no-acuoso; como una emulsión
 10 líquida de fase externa oleosa o una emulsión líquida de fase externa acuosa, a través de una formulación liposomal (véase, por ejemplo, EP 736299) o en alguna otra forma. Las composiciones administradas oralmente pueden incluir aglutinantes, lubricantes diluyentes inertes, lubricantes, agentes de superficie activa o agentes dispersantes, agentes saborizantes, y humectantes. Las formulaciones administradas oralmente, tales como comprimidos, se pueden recubrir o ranurar, y se pueden formular para proporcionar la liberación sostenida, retardada o controlada del
 15 ingrediente activo de las mismas.

Los péptidos se pueden co-administrar con otros agentes empleados para tratar los trastornos gastrointestinales, que incluyen pero no se limitan a los agentes descritos en la presente memoria.

En otro aspecto, composiciones farmacéuticas adecuadas pueden comprender uno o más de otros agentes terapéuticos. Tales agentes terapéuticos incluyen, sin limitación, agentes analgésicos; agentes anti-secretorios,
 20 incluyen inhibidores de la bomba de protones, antagonistas de la bomba ácida, antagonistas del receptor H2; inhibidores de la PDE5; antagonistas GABA-B; secuestradores del ácido biliar; agentes que promueven la cinética y la motilidad; antidepresivos; antibióticos; antieméticos; y agentes de protección de la mucosa.

Métodos de Tratamiento

En varias realizaciones, los péptidos y composiciones descritos en la presente memoria son útiles para el
 25 tratamiento del trastorno gastrointestinal de un paciente.

En algunas realizaciones, el trastorno gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en el síndrome intestinal irritable (IBS), estreñimiento, trastorno gastrointestinal funcional, enfermedad del reflujo gastroesofágico, pirosis funcional, dispepsia, dolor visceral, gastroparesis, pseudo-obstrucción intestinal crónica, pseudo-obstrucción colónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y enfermedad intestinal inflamatoria.

30 En otra realización, el trastorno gastrointestinal es el estreñimiento. El estreñimiento puede ser estreñimiento crónico, estreñimiento idiopático, debido al íleo post-operatorio, o causado por el uso de un opiáceo. Los criterios aceptados clínicamente que definen el estreñimiento incluyen la frecuencia de las deposiciones, la consistencia de las heces y la facilidad de la defecación. Una definición común del estreñimiento es realizar menos de tres deposiciones por semana. Otras definiciones incluyen heces anormalmente duras o defecación que requiere de un
 35 esfuerzo excesivo (Schiller 2001, Aliment Pharmacol Ther 15:749-763). El estreñimiento puede ser idiopático (estreñimiento funcional o estreñimiento de tránsito lento) o secundario de otras causas que incluyen trastornos neurológicos, metabólicos o endocrinos. Estos trastornos incluyen diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipocalcemia, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal, neurofibromatosis, neuropatía autónoma, enfermedad de Chagas, enfermedad Hirschprung y fibrosis quística. El estreñimiento puede

ser el resultado quirúrgico (íleo postoperatorio) o debido al uso de fármacos, tal como analgésicos (como los opioides), antihipertensivos, anticonvulsivantes, antidepresivos, antiespasmódicos y antipsicóticos.

5 En otras realizaciones, el trastorno gastrointestinal, es el síndrome intestinal irritable (IBS). El síndrome intestinal irritable puede ser síndrome intestinal irritable con estreñimiento predominante (c-IBS), síndrome intestinal irritable con diarrea predominante (d-IBS) o una alternancia entre los dos síndromes intestinales irritables (a-IBS).

En otras realizaciones, el trastorno gastrointestinal es la dispepsia.

En otras realizaciones, el trastorno gastrointestinal es gastroparesis. La gastroparesis se puede seleccionar de la gastroparesis idiopática, diabética o post-quirúrgica.

En otras realizaciones, el trastorno gastrointestinal es pseudo obstrucción intestinal crónica.

10 En otras realizaciones, el trastorno gastrointestinal es la enfermedad de Crohn.

En algunas realizaciones, el trastorno gastrointestinal es colitis ulcerosa.

En algunas realizaciones, el trastorno gastrointestinal es la enfermedad intestinal inflamatoria.

15 En otra realización, el trastorno gastrointestinal es el dolor visceral. En otra realización, la presente divulgación caracteriza un método para reducir el dolor gastrointestinal o el dolor visceral en un paciente, comprendiendo el método la administración al paciente una composición farmacéutica que comprende del péptido descrito en la presente memoria. Los péptidos agonistas descritos en la presente memoria, se pueden emplear en solitario o en terapia de combinación para el tratamiento, prevención o reducción del dolor visceral asociado con un trastorno gastrointestinal o un dolor asociado con otro trastorno.

20 En otra realización, la divulgación caracteriza un método para tratar la inflamación, incluyendo la inflamación del tracto gastrointestinal, por ejemplo, la inflamación asociada con un trastorno o infección gastrointestinal o con algún otro trastorno, comprendiendo el método la administración a un paciente de una composición farmacéutica que comprende un péptido purificado descrito en la presente memoria.

25 En otra realización, la divulgación caracteriza un método para tratar un trastorno gastrointestinal, que comprende administrar un agonista del receptor guanilato ciclasa (GC-C) intestinal, bien de forma oral, mediante supositorio rectal, o parenteralmente.

En otra realización, la divulgación caracteriza un método para tratar un trastorno gastrointestinal que comprende administrar un agonista del receptor guanilato ciclasa (GC-C) intestinal.

30 En otro aspecto, la divulgación caracteriza un método para incrementar el nivel de guanosina 3'-monofosfato cíclica (GMPc) en una muestra biológica, tejido (por ejemplo, la mucosa intestinal), o célula (por ejemplo, una célula que soporta el receptor GC-A), o un organismo completo, poniendo en contacto la muestra, tejido, u organismo a los péptidos descritos en la presente memoria.

35 Los péptidos agonistas del receptor GC-C descritos en la presente memoria se pueden administrar en combinación con otros agentes. Por ejemplo, los péptidos se pueden administrar con un péptido o compuesto analgésico. El péptido compuesto analgésico se puede unir covalentemente a un péptido descrito en la presente memoria o puede ser un agente separado que se administra conjunta o secuencialmente con un péptido descrito en la presente memoria en una terapia de combinación. Los péptidos descritos en la presente memoria, se pueden administrar también en combinación con otros agentes empleados para tratar trastornos GI que incluyen antidepresivos, agentes

que promueven la motilidad o la cinética, antieméticos, antibióticos, inhibidores de la bomba de protones, bloqueantes de ácido (por ejemplo, antagonistas del receptor de histamina H₂), antagonistas de la bomba ácida, inhibidores PDE5, agonistas GABA-B, secuestradores del ácido biliar, y agentes protectores de la mucosa.

5 En algunas realizaciones, los agentes analgésicos útiles se pueden emplear con los péptidos descritos en la presente memoria incluyen bloqueadores del canal de calcio (por ejemplo, ziconotida), antagonistas del receptor 5HT (por ejemplo, antagonistas del receptor 5HT₃, 5HT₄ y 5HT₁), agonistas 5HT₄ (por ejemplo, tegaserod [Zelnorm®], mosaprida, zacoprida, cisaprida, renzaprida, prucaloprida [Resolor®], derivados de benzimidazolona, tales como, BIMU 1 y BIMU 8, y lrexaprida), agonistas 5HT₁ (por ejemplo, sumatriptán y buspirona), agonistas del receptor opioide (por ejemplo, loperamida, fedotozina, pentapéptido de encefalina, morfina, difenoxilato, 10 fraquefamida, trimebutina y fentanilo), agonistas del receptor CCK (por ejemplo, loxiglumida y dexloxiglumida), antagonistas del receptor NK₁ (por ejemplo, aprepitant, vofopitant, ezlopitant, R-673 (Hoffmann-La Roche Ltd), SR-48968 y SR-14033, (Sanofi Synthelabo), CP-122.721 (Pfizer, Inc.), GW679769 (Glaxo Smith Kline) y TAK-637 (Takeda/Abbot)), antagonistas del receptor NK₂ (por ejemplo, nepadutant, saredutant, GW597599 (Glaxo Smith Kline), SR-144190 (Sanofi-Synthelabo) y UK-290795 (Pfizer Inc)), antagonistas del receptor NK₃ (por ejemplo, 15 osanetant (SR-142801; Sanofi-Synthelabo), SR-241586 y talnetant), inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina (NSRI) (por ejemplo, milnaciprán), antagonistas del receptor de dopamina mixto y selectivo (por ejemplo, metoclopramida, itoprida, domperidona), agonistas del receptor vanilloide y canabinoide, sialorfina y péptidos relacionados con sialorfina. En la bibliografía se describen varias clases de agentes analgésicos.

20 En algunas realizaciones, se pueden emplear en combinación con los péptidos descritos en la presente memoria uno o más de otros agentes terapéuticos. Tales agentes incluyen antidepresivos, agentes que promueven la motilidad o la cinética, antieméticos, antibióticos, inhibidores de la bomba de protones, bloqueantes de ácido (por ejemplo, antagonistas del receptor de histamina H₂), antagonistas de la bomba ácida, inhibidores PDE5, agonistas GABA-B, secuestradores del ácido biliar, y agentes protectores de la mucosa.

25 Ejemplos de antidepresivos incluyen, sin limitación, antidepresivos tricíclicos, tales como, amitriptilina (Elavil®), desipramina (Norpramin®), imipramina (Tofranil®), amoxapina (Asendin®), nortriptilina; inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI's), tal como paroxetina (Paxil®), fluoxetina (Prozac®), sertralina (Zoloft®) y citalopram (Celexa®); y otros, tales como, doxepina (Sinequan®) y trazodona (Desyrel®).

Ejemplos de agentes que promueven la motilidad y la cinética incluyen, sin limitación, itoprida, octreotide, betanecol, metoclopramida (Reglan®), domperidona (Motilium®), eritromicina (y derivados del mismo) y cisaprida (Propulsid®).

30 Un ejemplo de antieméticos incluye, sin limitación, proclorperazina.

Ejemplos de antibióticos que se pueden emplear incluyen aquellos que pueden ser empleados para tratar infecciones por *Helicobacter pylori*, tales como amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, o claritromicina. Otros antibióticos, tales como eritromicina y derivados del mismo, se pueden usar en combinación con los péptidos descritos en la presente memoria.

35 Ejemplos de inhibidores de la bomba de protones incluyen, sin limitación, omeprazol (Prilosec®), esomeprazol (Nexium®), lansoprazol (Prevacid®), pantoprazol (Protonix®) y rabeprazol (Aciphex®). Ejemplos de bloqueantes del receptor H₂ incluyen, sin limitación, cimetidina, ranitidina, famotidina y nizatidina. Ejemplos de antagonistas de la bomba ácida incluyen, sin limitación, revaprazan, CS-526 (J. Pharmacol. Exp. Ther. (2007) 323:308-317), PF-03716556 (J. Pharmacol. Exp. Ther. (2009) 328(2):671-9), y YH1885 (Drug Metab. Dispos. (2001) 29(1):54-9).

Ejemplos de inhibidores de PDE5 incluyen, sin limitación, avanafil, lodenafil, mirodenafil, citrato de sildenafil, tadalafil, vardenafil y udenafil. Agonistas GABA-B incluyen, sin limitación, baclofeno y XP19986 (CAS Registro N° 847353-30-4). Ejemplos de secuestradores del ácido biliar incluyen, sin limitación, GT102-279, colestiramina, colesevelam, hidrocloreuro de colesevelam, ácido ursodesoxicólico, colestipol, colestilan, sevelamer, polidialilamina entrecruzada con epiclohidrina, derivados de dialquilaminoalquilo de un dextrano entrecruzado y N-(cicloalquil)alquilaminas. Ejemplos protectores de la mucosa incluyen, sin limitación, sucralfato (Carafate®), teprenona, polaprezinc, cetraxato y subsalicilato de bismuto.

La combinación terapéutica se puede alcanzar mediante la administración de dos o más agentes, por ejemplo, un péptido descrito en la presente memoria y otro péptido o compuesto terapéutico, cada uno de los cuales se formula y se administra separadamente, o mediante la administración de dos o más agentes en una única formulación. Mediante combinación terapéutica también se puede abarcar otras combinaciones. Por ejemplo, dos agentes se pueden formular juntos y administrarse junto con una formulación independiente que contiene un tercer agente. Aunque los dos o más agentes en la combinación terapéutica se pueden administrar simultáneamente, no es necesario. Por ejemplo, la administración de un primer agente (o combinación de agentes) puede preceder a la administración de un segundo agente (o combinación de agentes) en minutos, horas, días o semanas. Por tanto, los dos o más agentes se pueden administrar en minutos el uno del otro o en 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, ó 24 horas el uno del otro o en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 días el uno del otro o en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 semanas el uno del otro. En algunos casos es posible intervalos más largos. Aunque en muchos casos es deseable que los dos o más agentes empleados en una combinación terapéutica estén presentes en el cuerpo del paciente al mismo tiempo, esto no necesita ser así.

Dosificación

El intervalo de dosificación para seres humanos adultos puede ser generalmente de 5 µg a 100 mg/día oralmente de los péptidos descritos en la presente memoria. Comprimidos, cápsulas, u otras formas de presentación proporcionadas en unidades separadas pueden tener convenientemente una cantidad del compuesto descrito en la presente memoria que es eficaz a tal dosificación o como una dosificación múltiple de la misma, por ejemplo, unidades que contienen de 25 µg a 2 mg o alrededor de 100 µg a 1 mg. La cantidad precisa del compuesto prescrito a un paciente será la responsabilidad del médico encargado. Sin embargo, la dosificación empleada dependerá de un número de factores, incluyendo la edad y sexo del paciente, el trastorno que está siendo tratado, y su gravedad.

En varias realizaciones, la dosis unitaria se administra con comida en cualquier momento del día, sin comida en cualquier momento del día, con comida después de ayuno nocturno (por ejemplo con el desayuno), a la hora de acostarse después de un tentempié escaso. En una realización particular, la dosis unitaria se administra antes o después de consumir un alimento (por ejemplo, una comida). En otra realización la dosis unitaria se administra aproximadamente de 15 minutos a 1 hora antes de la consumición de un alimento. En varias realizaciones, la dosis unitaria se administra una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día o seis veces al día. En determinadas realizaciones, la dosis unitaria y la dosis diaria son equivalentes.

La cantidad precisa de cada uno de los dos o más ingredientes activos en una dosis unitaria, dependerá de la dosis deseada de cada componente. Por tanto, puede ser útil crear una dosis unitaria que, cuando se administre según un programa de dosificación particular (por ejemplo, un programa de dosificación fijado por un número determinado de unidades y en un momento particular de administración), repartirá la misma dosis de cada componente como el que podría administrarse si el paciente hubiese sido tratado con sólo un único componente. En otras circunstancias, podría ser deseable crear una dosis unitaria que repartiera una dosis de uno o más componentes que es menor que

la que se administraría si el paciente hubiese sido tratado sólo con un único componente. Por último, podría ser deseable crear una dosis unitaria que reparta una dosis de dos o más componentes que sea mayor que la que se administraría si el paciente hubiese sido tratado sólo con un único componente.

5 La composición farmacéutica puede incluir ingredientes adicionales, que incluyen, pero no se limitan a los excipientes descritos en la presente memoria. En determinadas realizaciones, pueden existir uno o más agentes terapéuticos de la dosis unitaria en una formulación de liberación prolongada o controlada y en una formulación de liberación prolongada puede no haber agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, en una formulación de liberación controlada o formulación de liberación prolongada puede haber un péptido o agonista descrito en la presente memoria, en la misma dosis unitaria con otro agente que puede ser o no, bien una formulación de liberación controlada, o bien una formulación de liberación prolongada. Por tanto, en determinadas realizaciones, puede ser deseable proporcionar la liberación inmediata de uno o más de los agentes descritos en la presente memoria, y la liberación controlada de uno o más de otros agentes.

15 La presente invención se ha descrito en referencia a determinados ejemplos de realizaciones de las mismas. Sin embargo, será fácilmente evidente por los expertos en la técnica que es posible representar la invención en formas específicas diferentes a las de los ejemplos de las realizaciones descritos anteriormente. Los ejemplos de las realizaciones son simplemente ilustrativos y no deberán considerarse restrictivos de ninguna manera. El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas, y no por la descripción anterior.

Ejemplos

20 Los péptidos agonistas del GC-C o sales de los mismos aceptables farmacéuticamente, como se describen en la presente memoria, se prepararon mediante síntesis química en fase sólida y plegamiento natural (oxidación al aire) por American Peptide Company (Sunnyvale, CA). En algunos casos los péptidos se modificaron después de las síntesis, como se describe en la presente memoria.

25 El péptido Cys₁-IMD se sintetizó mezclando 4,6 g (3,0 mmol) de linaclotida en 200 ml de EtOH. Se añadió formaldehído al 37% (1,12 ml/5eq) a esta mezcla. La mezcla de reacción se incubó al baño maría (45°C) durante la noche. Al día siguiente el disolvente se eliminó por evaporación rotativa. El péptido se purificó además a través de una cromatografía en fase inversa.

30 El péptido Glu₃-éster de etilo (un péptido de referencia) se sintetizó en una resina Wang-Fmoc-Tyr(tBu) 20 mmol. Los grupos protectores que se emplearon para los aminoácidos son grupo t-Butilo para Tyr y Thr, grupo Trt para Asn y Cys. La cadena de péptido se ensambló en la resina mediante la eliminación repetitiva del grupo de protección Fmoc y el acoplamiento del aminoácido protegido. Se emplearon DIC y HOBt como reactivos de acoplamiento, y se empleó NMM como la base para esta reacción. Como reactivo Fmoc se empleó piperidina 20% en DMF. Después de eliminar el último grupo de protección Fmoc, la resina se trató con cóctel K durante 3 horas para separar el péptido de la resina, y eliminar los grupos protectores de la cadena lateral. El péptido eluído se precipitó en éter frío y se secó. El péptido seco se disolvió en una mezcla de TFA/TIS/agua (95:3:2 v/v) en una proporción de 1 a 10 (g/v).
35 Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El péptido aislado se precipitó también en éter frío, se recogió mediante filtración y se secó a vacío.

40 El péptido Tyr₁₄-éster de etilo (un péptido de referencia) se sintetizó mediante un método de condensación de fragmento. El fragmento A (Boc-Cys(Trt)-Cys(Trt)-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Cys(Trt)-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Cys(Trt)-Thr(tBu)-Gly-OH) se preparó en una resina CTC de 15 mmol empleando química Fmoc. Esta cadena de péptido se ensambló también en la resina mediante eliminación repetitiva del grupo de protección Fmoc, y el acoplamiento del

aminoácido protegido. Se emplearon DIC y HOBt como reactivos de acoplamiento y se empleó NMM como la base. Como reactivo Fmoc se empleó piperidina 20% en DMF. Después de eliminar el último grupo de protección Fmoc, se acopló Boc para proteger el grupo amino N-terminal. El péptido de la resina se lavó, secó y trató con 1% de TFA/DCM para separar el péptido de la resina. El fragmento B(Cys(Trt)-Tyr-OEt) se preparó por acoplamiento de Fmoc-Cys(Trt)-OH y Tyr-OEt. HCl. El grupo Fmoc se eliminó mediante el tratamiento de este dipéptido con piperidina 20% en DMF.

El péptido de Tyr₁₄-éster de etilo se sintetizó finalmente por acoplamiento de dos fragmentos en DMF. Se empleó HBTU/HOBt/NMM como agente de acoplamiento de esta reacción. Los grupos de protección se eliminaron mediante tratamiento del péptido con cóctel K durante 2 horas. Este péptido se precipitó en éter frío y se secó. El péptido seco se disolvió en una mezcla de TFA/TIS/agua (95:3:2v/v) en una proporción de 1 a 10 (g/v). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora. El péptido aislado se precipitó de nuevo en éter frío, se recogió mediante filtración y se secó a vacío.

Ejemplo 1: Acumulación de GMPc en células T84 para el análisis de la actividad GC-C

Para el análisis de GMPc, se cultivaron $4,5 \times 10^5$ células/mL de células T84 durante la noche en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos. Al día siguiente, las células T84 se lavaron dos veces con 1 mL de DMEM (pH 7). Después del segundo lavado las células se incubaron con 450 μ L de isobutilmetilxantina (IBMX) 1 mM, en pH 7 tampón durante 10 minutos a 37°C para inhibir cualquier actividad de la fosfodiesterasa. Los péptidos se diluyeron entonces en tampón DMEM (pH 7) hasta una concentración 10x. La disolución peptídica de 50 μ L se diluyó con las células T84 hasta un volumen final de 500 μ L, llevando la concentración de cada péptido a una concentración 1x. Los péptidos se ensayaron por duplicado en 100 nM.

No se usó péptido control para determinar los niveles endógenos de GMPc. Los péptidos se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después de 30 minutos, se eliminaron los sobrenadantes y las células se lisaron con HCl 0,1 M. Las células se lisaron en hielo durante 30 minutos. Después de 30 minutos, los lisados se pipetearon y colocaron en una placa de HPLC de 96 pocillos y se sometieron a 10.000 x G durante 10 minutos para eliminar cualquier desecho celular. Los sobrenadantes del primer giro se eliminaron y colocaron en una placa HPLC de 96 pocillos en fresco.

Las concentraciones de GMPc se determinaron a partir de cada muestra empleando las condiciones LC/MS (Tabla 1 de a continuación) y se calculó la curva estándar. Los valores EC₅₀ se calcularon a partir de las curvas de concentración-respuesta generadas con el programa informático GraphPad Prism.

Tabla 1: condiciones LC/MS

MS:	Thermo Quantum					
Modo Iónico:	ESI ⁺					
Tipo de Escáner:	MRM					
Compuesto:	Transición	Tiempo de Permanencia (mseg)	Energía de Colisión (V)	Lentes en Tubo	Tiempo de Retención (min)	
GMPc	346 > 152	100	28	139	1,0	

ES 2 638 589 T3

HPLC:	Tecnologías Agilent Series 1200 con Análisis CTC HTS PAL		
Columna:	Thermo Hypersil Oro 2,1 x 50 mm tamaño de partícula de 5 micras		
Velocidad de Flujo:	400 µL/min		
Temperatura de la Columna:	RT (Temperatura Ambiente)		
Temperatura del Cargador de Muestras:	6°C		
Volumen de Inyección:	20 µL		
Fases Móviles:	A = 98:2 Agua:Acetonitrilo + Ácido Fórmico 0,1% B = 2:98 Agua:Acetonitrilo + Ácido Fórmico 0,1%		
Gradiente:	Tiempo (min)	% A	% B
	0	100	0
	0,3	30	70
	2,00	30	70
	2,01	100	0
	4	100	0

Ejemplo 2: Afinidad de unión relativa de ejemplos de péptidos para el receptor GC-C de células T84

Se determinaron las afinidades de unión relativas de linaclotida y Cys₁-IMD para el receptor guanilato ciclasa C (GC-C) empleando un ensayo de unión competitivo en el que los péptidos compitieron con un agonista GC-C conocido, una enterotoxina termoestable derivada del cerdo (pSTa), para los sitios de unión en los receptores GC-C en la superficie celular de las células epiteliales colónicas (T84) humanas. El pSTa se radioetiquetó con I¹²⁵ para permitir la medición de su unión al receptor. El ensayo de unión competitivo se realizó mediante la adición de varias concentraciones de cada péptido (de 0,1 a 3.000 nM) a 0,20 mL de las mezclas de reacción que contienen un medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA), 2,0 x 10⁵ de células T84, y 170 pM [I¹²⁵]-pSTa (200.000 cpm). Los datos se emplearon para construir curvas de unión competitiva al radioligando, y para determinar las afinidades de unión relativas de linaclotida y Cys₁-IMD, como medida para sus valores IC₅₀ y K_i.

Tanto linaclotida como Cys₁-IMD inhibieron competitivamente la unión específica de [I¹²⁵]-pSTa a los receptores GC-C de la superficie celular de las células T84. Sus afinidades de unión relativa medidas por sus constantes de inhibición (K_i) fueron como siguen: Linaclotida K_i = 3,9 ± 1,6 nM y Cys₁-IMD K_i = 1,4 ± 0,5 nM (Figura 3).

Ejemplo 3: Respuesta inducida sobre GMPc en células T84 mediante ejemplos de péptidos

Linaclotida y Cys₁-IMD se ensayaron para la actividad agonista de guanilato ciclasa-C (GC-C) en células T84, como sigue. Se incubaron primero en cada pocillo de una placa con 96 pocillos, aproximadamente 200.000 células T84/pocillo con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 1 mM, en 0,18 mL de medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco durante 10 minutos a 37°C. Cada péptido se diluyó hasta concentraciones finales que oscilan de 0,1 a 10.000 nM, y se añadieron 0,02 mL de cada dilución por duplicado a los 96 pocillos de la placa que contienen las células T84, hasta un volumen final de 0,20 mL por pocillo. Las reacciones del péptido se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, se eliminaron y se desecharon los sobrenadantes y las células se lisaron con ácido clorhídrico frío (HCl) 0,1 M durante 30 minutos en hielo. El residuo celular se eliminó mediante centrifugación y se determinó la concentración de guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (GMP cíclica) en cada lisado, empleando cromatografía líquida con espectrometría de masas tándem. Los datos se emplearon para construir las curvas de respuesta-dosificación y se calcularon los valores de la concentración eficaz media máxima (EC₅₀) para cada producto de ensayo.

Linaclotida y Cys₁-IMD mostraron actividad agonista de GC-C en células T84, medidas por el incremento de GMPc intracelular (Figura 4). Los valores EC₅₀ para linaclotida y Cys₁-IMD fueron 315 ± 105 nM y 172 ± 32 nM, respectivamente.

Ejemplo 4: Medición del contenido y pureza de los ejemplos de péptidos

El contenido y pureza de los péptidos de la presente divulgación, se pueden determinar mediante cromatografía líquida en gradiente de fase inversa empleando un Sistema LC 1100 Serie Agilent con un programa informático Chemstation Rev A.09.03 o equivalente. Se empleó una columna C18 A YMC Pro™ (dimensiones: 3,0 x 150 mm, 3,5 µm, 120 Å; Waters Corp., Milford, MA) o equivalente, y se mantuvo a 40°C. La fase móvil A (MPA) consiste en agua con ácido trifluoroacético 0,1%, mientras que la fase móvil B (MPB) consiste en acetonitrilo 95%: Agua 5% con ácido trifluoroacético 0,1%. La elución de los péptidos se realizó con un gradiente de 0% a 47% de MPB durante 28 minutos, seguido por una subida hasta el 100% de MPB durante 4 minutos, con un tiempo retenido de 5 minutos hasta el 100% de MPB, para lavar la columna. La re-equilibración de la columna, se realizó volviendo hasta el 0% de MPB durante 1 minuto, seguido de 10 minutos de mantenimiento hasta el 100% de MPA. La velocidad de flujo es de 0,6 mL/min y la detección se realizó mediante luz UV a 220 nm.

Las muestras para el análisis se prepararon mediante la adición de los contenidos de las cápsulas de los péptidos de los ejemplos en HCl 0,1 N para obtener una concentración diana de 20 µg de péptido/mL. 100 µL de esta disolución se inyectó en la columna.

30 *Péptido Cys₁-IMD*

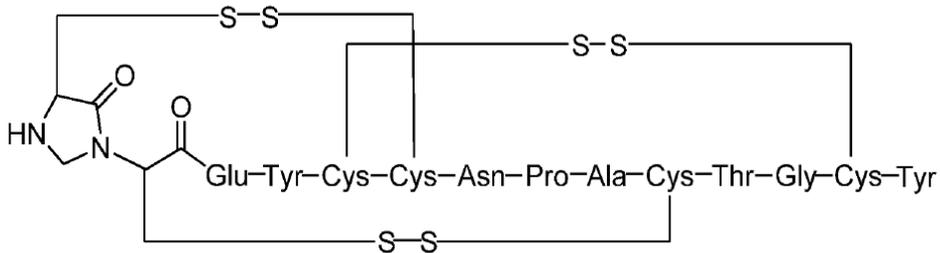
El péptido Cys₁-IMD se purificó empleando una columna C18 Waters 2-pulgadas con tampón TFA 0,1% con un gradiente lineal de 15-45% durante 60 minutos con tampón B a una velocidad de flujo de 100 mL/min. Las fracciones combinadas con una pureza en tono al 95%, se cargaron en la columna C18. Después de equilibrar la columna con tampón TEAP y tampón AA, el péptido se purificó y eluyó con tampón HAC con un gradiente lineal de 15-75% del tampón B durante 60 minutos. Las fracciones combinadas con péptido purificado se liofilizaron hasta desecación. En la Figura 2 se muestra un análisis de un producto de linaclotida y Cys₁-IMD por HPLC-RP.

Péptido Glu₃-éster de etilo

El Péptido Glu₃-éster de etilo (6,0 g) se disolvió en 12 L de bicarbonato amónico 0,05 M en agua, y el proceso de oxidación se monitorizó mediante un ensayo Ellman, MS y ensayo HPLC. El proceso de oxidación tardó aproximadamente 48 horas hasta que se completó.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido o una sal del mismo aceptable farmacéuticamente, en donde el péptido comprende la estructura aminoácida de:



5 2. El péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente según la reivindicación 1, en donde el péptido consiste en dicha estructura aminoácida.

3. El péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el péptido activa el receptor guanilato ciclasa C.

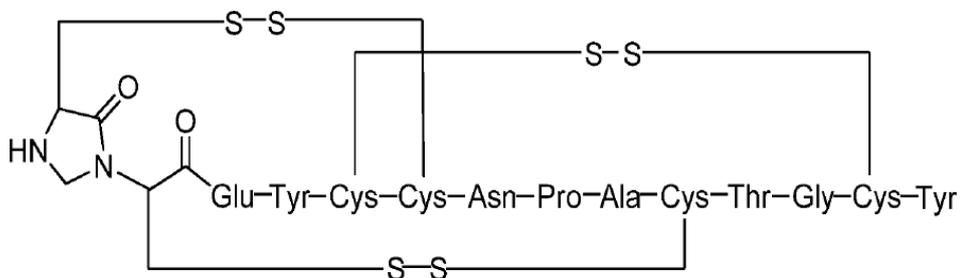
4. El péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente según la reivindicación 1, en donde: el péptido
10 comprende 30 aminoácidos o menos; o el péptido comprende 20 aminoácidos o menos.

5. El péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente, se aísla o purifica.

6. Una composición farmacéutica que comprende un péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

15 7. La composición farmacéutica según la reivindicación 6, en donde la composición farmacéutica comprende además linaclotida.

8. La composición farmacéutica según la reivindicación 6, en donde el péptido consiste en la estructura aminoácida de:



20 y el péptido comprende al menos el 90% en peso comparado con el peso de linaclotida u otro agonista de la guanilato ciclasa C.

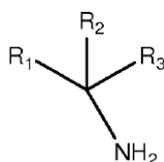
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde la composición farmacéutica consiste esencialmente del péptido o sal del mismo aceptable farmacéuticamente.

10. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende además, un catión seleccionado de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+ y Al^{3+} .

5 11. La composición farmacéutica según la reivindicación 10, en donde dicho Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+ o Al^{3+} se proporciona como acetato de magnesio, cloruro de magnesio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, acetato cálcico, cloruro cálcico, fosfato cálcico, sulfato cálcico, acetato de zinc, cloruro de zinc, fosfato de zinc, sulfato de zinc, acetato de manganeso, cloruro de manganeso, fosfato de manganeso, sulfato de manganeos, acetato potásico, cloruro potásico, fosfato potásico, sulfato potásico, acetato sódico, cloruro sódico, fosfato sódico, sulfato sódico, acetato de aluminio, cloruro de aluminio, fosfato de aluminio o sulfato de aluminio.

12. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende además una amina primaria impedida estéricamente, en donde la amina primaria impedida estéricamente es un aminoácido que se selecciona de un aminoácido que aparece de manera natural, un aminoácido que aparece de manera no natural y un aminoácido derivado, y en donde el aminoácido que aparece de manera natural es histidina, fenilalanina, alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, leucina, metionina, asparragina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano o valina, o el aminoácido que aparece de manera no natural es ácido 1-aminociclohexano carboxílico, lantanina o teanina.

13. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende además una amina primaria impedida estéricamente, en donde la amina primaria impedida estéricamente tiene la fórmula:



20 en donde, R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente a partir de: H, C(O)OH, alquilo de C1-C6, alquiléter de C1-C6, alquiltioéter de C1-C6, ácido carboxílico de alquilo de C1-C6, carboxilamida y alquilarilo de alquilo de C1-C6, en donde cualquier grupo se puede sustituir una o múltiples veces con: halógeno o amino, siempre y cuando no más de R₁, R₂ y R₃ sean H.

25 14. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende además una amina primaria impedida estéricamente, en donde la amina primaria impedida estéricamente es ciclohexilamina, 2-metilbutilamina, o una amina polimérica, en donde la amina polimérica es opcionalmente, chitosán.

15. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde dicha composición farmacéutica comprende además Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+ o Al^{3+} .

30 16. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-15, que comprende además un antioxidante, en donde dicho antioxidante es BHA, vitamina E o galato de propilo.

17. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-16, que comprende además un aglutinante o aditivo aceptable farmacéuticamente, en donde el aglutinante o aditivo aceptable farmacéuticamente se selecciona de alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona (povidona), un almidón, maltodextrina y un éter de celulosa,

en donde, el éter de celulosa se selecciona de: metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietil celulosa, hidroxietil metilcelulosa, hidroxipropil celulosa e hidroxipropil metilcelulosa.

5 18. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-17, que comprende además un rellenedor aceptable farmacéuticamente, en donde el rellenedor aceptable farmacéuticamente es celulosa, isomaltosa, manitol o fosfato cálcico díbasico, en donde la celulosa se selecciona opcionalmente a partir de celulosa microfina y celulosa microcristalina.

10 19. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-18, que comprende además un agente terapéutico adicional, en donde dicho agente terapéutico adicional se selecciona de uno o más de un agente analgésico, un antidepresivo, un agente que promueve la motilidad o la cinética, un antiemético, un antibiótico, un inhibidor de la bomba de protones, un bloqueante de ácido, un inhibidor de la PDE5, un antagonista de la bomba ácida, un agonista GABA-B, un secuestrador del ácido biliar y un agente de protección de la mucosa.

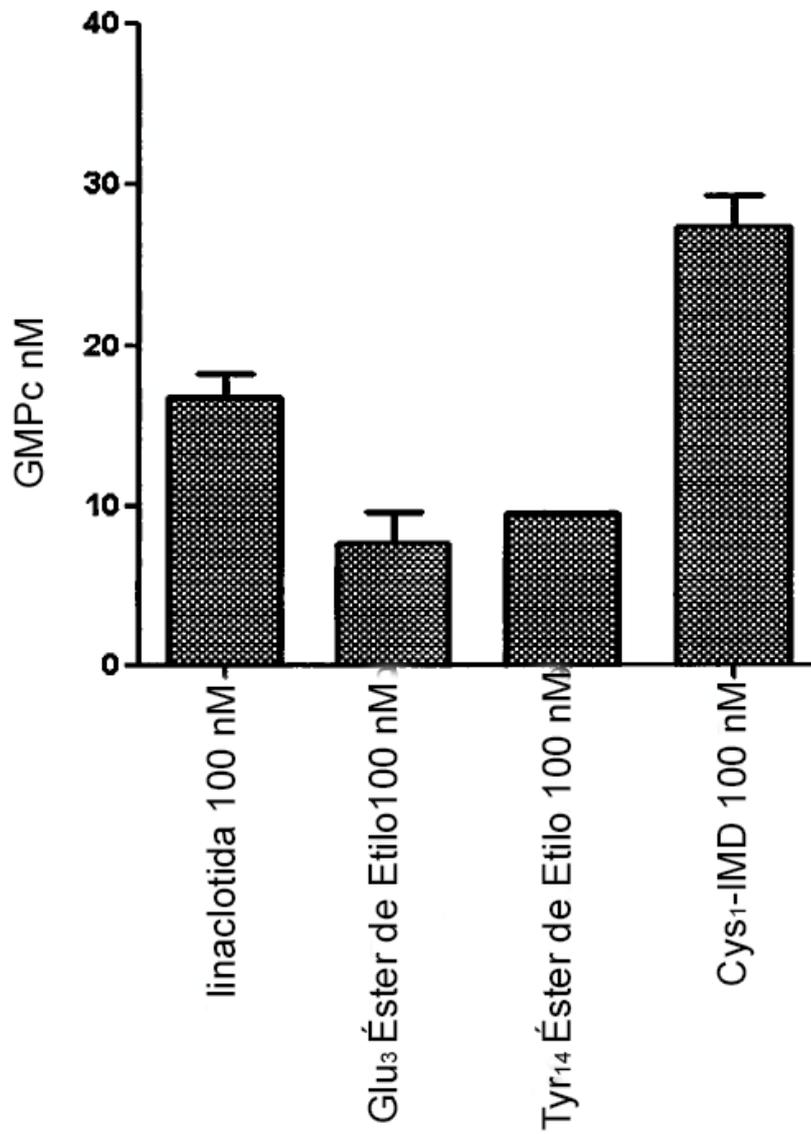
20. Una dosis unitaria que comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-19, en donde dicha dosis unitaria es una cápsula o comprimido, o comprende de 5 µg a 1 mg de dicho péptido.

15 21. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-19 para usar en un método para tratar un trastorno gastrointestinal.

20 22. La composición farmacéutica para usar de la reivindicación 21, en donde el trastorno gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en: el síndrome intestinal irritable (IBS), en donde el síndrome intestinal irritable es síndrome de intestino irritable con estreñimiento predominante, (c-IBS), síndrome intestinal irritable con diarrea predominante (d-IBS) o una alternancia entre los dos síndromes intestinales irritables (a-IBS); estreñimiento, en donde el estreñimiento es estreñimiento crónico, estreñimiento idiopático, debido al íleo post-operatorio, o causado por el uso de un opioide; un trastorno gastrointestinal funcional; la enfermedad del reflujo gastroesofágico; pirosis funcional; dispepsia; dolor visceral; gastroparesis, en donde dicha gastroparesis es una gastroparesis idiopática, diabética o post-quirúrgica; pseudo-obstrucción intestinal crónica; pseudo-obstrucción colónica; enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa; y enfermedad intestinal inflamatoria.

25 23. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-19 para usar en un método para incrementar la motilidad intestinal de un paciente.

FIGURA 1



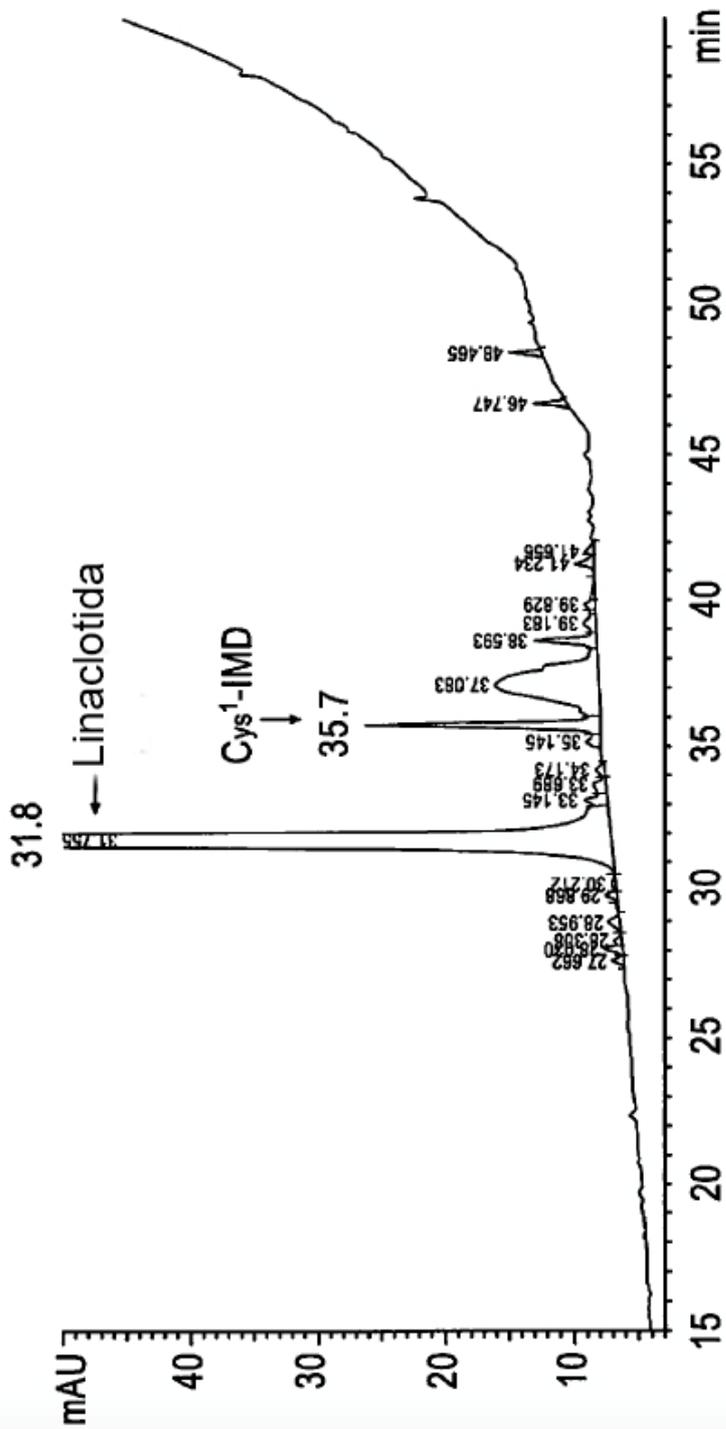


FIGURA 2

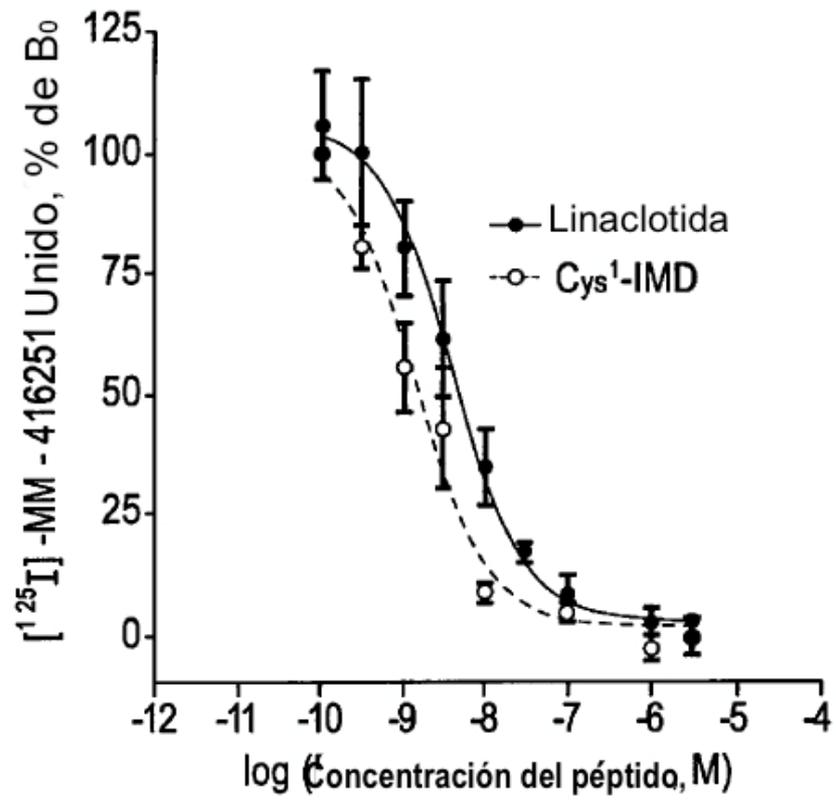


FIGURA 3

FIGURA 4

