

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 873**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2012 PCT/US2012/027287**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12118972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2012 E 12752488 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2681236**

54 Título: **Proceso de preparación de agonistas de guanilato ciclasa C**

30 Prioridad:

01.03.2011 US 201161447891 P

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

23.04.2018

73 Titular/es:

**SYNERGY PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
420 Lexington Avenue Suite 1609
New York, NY 10170, US**

72 Inventor/es:

**BAI, JUNCAI;
ZHANG, RUOPING;
JIAN, JUN;
ZHOU, JUNFENG;
ZHAO, QIAO;
ZHANG, GUOQUING;
SHAILUBHAI, KUNWAR;
COMISKEY, STEPHEN y
FENG, RONG**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 664 873 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

Proceso de preparación de agonistas de guanilato ciclasa C

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos de preparación de agonistas de péptidos de guanilato ciclasa C útiles para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades y trastornos.

Antecedentes de la invención

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

15 En los intestinos, la guanilina y la uroguanilina actúan como reguladores del equilibrio de líquidos y electrolitos. En respuesta al alto consumo de sal oral, estos péptidos se liberan en la luz intestinal donde se unen a la guanilato ciclasa C localizada en la membrana luminal de los enterocitos (células epiteliales cilíndricas simples del intestino delgado y del colon). La unión de los péptidos de guanilina a la guanilato ciclasa C induce la excreción de electrolitos y agua en la luz intestinal a través de una compleja cascada de señalización intracelular que se inicia por un aumento en el guanosín monofosfato cíclico (cGMP).

20 La señalización mediada por cGMP que es iniciada por los péptidos de guanilina es crítica para el funcionamiento normal del intestino. Cualquier anomalía en este procedimiento podría conducir a trastornos gastrointestinales tales como el síndrome del intestino irritable (IBS) y las enfermedades inflamatorias del intestino. La enfermedad inflamatoria del intestino es un nombre general que se le da a un grupo de trastornos que causan que los intestinos se inflamen, caracterizados por tejido rojo e hinchado. Los ejemplos incluyen colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria grave que afecta predominantemente el íleon y el colon, pero también puede ocurrir en otras secciones del tracto gastrointestinal. La colitis ulcerosa es exclusivamente una enfermedad inflamatoria del colon, el intestino grueso. A diferencia de la enfermedad de Crohn, en la que están involucradas todas las capas del intestino, y en la que puede haber intestino sano normal entre parches del intestino enfermo, la colitis ulcerosa afecta solo el revestimiento interno (mucosa) del colon de manera continua. Dependiendo de qué parte del tracto gastrointestinal esté involucrado, la enfermedad de Crohn se puede denominar ileítis, enteritis regional, colitis, etc. La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa difieren del colon espástico o el síndrome del intestino irritable, que son trastornos de motilidad del tracto gastrointestinal. La inflamación gastrointestinal puede ser una afección crónica. Se estima que hasta 1,000,000 de estadounidenses padecen la enfermedad inflamatoria intestinal, y que los pacientes masculinos y femeninos parecen estar igualmente afectados. La mayoría de los casos se diagnostican antes de los 30 años, pero la enfermedad puede ocurrir en la sexta, séptima y últimas décadas de la vida.

35 El IBS y el estreñimiento idiopático crónico son afecciones patológicas que pueden causar una gran cantidad de malestar intestinal y angustia, pero a diferencia de las enfermedades inflamatorias del intestino, el IBS no causa la inflamación o cambios graves en el tejido intestinal y no se cree que aumente el riesgo de cáncer colorrectal. En el pasado, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad celíaca y el IBS se consideraban trastornos completamente separados. Ahora, con la descripción de la inflamación, a pesar de bajo grado, en el IBS, y de la superposición de síntomas entre el IBS y la enfermedad celíaca, esta afirmación se ha cuestionado. La gastroenteritis bacteriana aguda es el factor de riesgo más fuerte identificado hasta la fecha para el posterior desarrollo del síndrome de intestino irritable postinfeccioso. Los factores de riesgo clínico incluyen enfermedad aguda prolongada y la ausencia de vómitos. Una susceptibilidad determinada genéticamente a los estímulos inflamatorios también puede ser un factor de riesgo para el síndrome del intestino irritable. La fisiopatología subyacente indica aumento de la permeabilidad intestinal e inflamación de bajo grado, así como movilidad alterada y sensibilidad visceral. La serotonina (5-hidroxitriptamina [5-HT]) es un modulador clave de la función intestinal y se sabe que desempeña un papel importante en la fisiopatología del IBS. La actividad de 5-HT está regulada por cGMP.

40 Aunque no se conocen las causas precisas de IBS y enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), una interrupción en el procedimiento de renovación continua de la mucosa gastrointestinal puede contribuir a la patología de la enfermedad en la IBD y agravar el IBS. El procedimiento de renovación del revestimiento gastrointestinal es un procedimiento eficiente y dinámico que implica la proliferación continua y el reabastecimiento de células dañadas no deseadas. Las tasas de proliferación de las células que recubren la mucosa gastrointestinal son muy altas, solo se superan por el sistema hematopoyético. La homeostasis gastrointestinal depende tanto de la proliferación como de

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

Además de un papel para la uroguanilina y la guanilina como moduladores del fluido intestinal y la secreción iónica, estos péptidos también pueden estar implicados en la renovación continua de la mucosa gastrointestinal manteniendo el equilibrio entre la proliferación y la apoptosis. Por ejemplo, los péptidos de uroguanilina y guanilina parecen promover la apoptosis mediante el control del flujo de iones celulares. Dada la prevalencia de afecciones inflamatorias en las sociedades occidentales, existe la necesidad de mejorar las opciones de tratamiento para las afecciones inflamatorias, particularmente del tracto gastrointestinal.

Los agonistas peptídicos de los agonistas de guanilato ciclasa C ("agonistas de GCC") se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,041,786, 7,799,897, y la Publicación de la Solicitud de las Patentes de los Estados Unidos Nos. US2009/0048175, US 2010/0069306, US 2010/0120694, US 2010/0093635, y US 2010/0221329. Sin embargo, la síntesis en fase sólida de péptidos para aplicaciones farmacéuticas presenta una serie de problemas especiales tales como un bajo rendimiento global (por ejemplo, inferior al 10%).

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento de preparación de un péptido como se define en las reivindicaciones adjuntas, particularmente un péptido que comprende la secuencia de un agonista peptídico de guanilato ciclasa C ("GCC"). La secuencia agonista de GCC se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-44 y 99-107. La secuencia agonista de GCC tiene n unidades de aminoácidos de longitud, con la unidad N-terminal en la posición 1 y la unidad C-terminal en la posición n.

El procedimiento de la invención incluye síntesis en fase sólida o en fase líquida y en fase de solución de fragmentos de péptidos apropiados, condensación posterior de fragmentos en una solución para formar un péptido en bruto lineal, y ciclación oxidativa opcional de residuos de aminoácidos de cisteína del péptido lineal en bruto para formar el producto final ciclado. Particularmente, el procedimiento incluye las siguientes etapas:

proporcionar un primer fragmento que tiene una primera secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición j hasta la posición k de la secuencia agonista de GCC, en el que j es un número entero entre 1 y n-1, k es un número entero entre 2 y n y es superior a j, y el primer fragmento está protegido excepto por un grupo amino de la unidad de aminoácido en la posición j, o alternativamente, un grupo carboxilo de la unidad de aminoácido en la posición k,

proporcionar un segundo fragmento que tiene una segunda secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición j-1 de la secuencia agonista de GCC o que tiene una tercera secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición k+1 hasta la posición m de la secuencia agonista de GCC, en el que h es un número entero entre 1 y n-2 y es más pequeño que j, m es un número entero entre k+2 y n, y el segundo fragmento está protegido excepto por un grupo carboxilo de la unidad de aminoácidos en la posición j-1 o un grupo amino de la unidad de aminoácidos en la posición k+1, en el que al menos uno del primer y segundo fragmentos está protegido a través de una síntesis de péptidos en fase sólida; y

el acoplamiento del primer y segundo fragmentos mediante una síntesis en fase de solución para la producción de un péptido protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición k de la secuencia agonista de GCC o un péptido protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácido desde posición j hasta la posición m de la secuencia agonista de GCC, en el que el péptido se purifica mediante un procedimiento que comprende la adsorción del péptido en una columna adsorbente polimérica, enjuagando opcionalmente el péptido con agua desionizada, eluyendo el péptido opcionalmente enjuagando la columna adsorbente polimérica con una solución acuosa de isopropanol para formar una solución del péptido, eliminando agua y el isopropanol de la solución peptídica para precipitar el péptido, y opcionalmente añadiendo un éter al péptido deshidratado para facilitar la precipitación del péptido.

El procedimiento de la invención puede incluir una o más de las características descritas en las siguientes realizaciones.

En una realización, la secuencia agonista de GCC se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 8 y 9.

5 En una realización, la secuencia agonista de GCC es SEQ ID NO: 1 o 9. En una realización, h es 1, j es 7, y k es 16. Más específicamente, el primer fragmento tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 7 hasta la posición 16 de SEQ ID NO: 1 o 9 y el segundo fragmento tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición 6 de SEQ ID NO: 1 o 9. En otra realización, h es 7, j es 15, y k es 16. Más específicamente, el primer fragmento tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 15 hasta la posición 16 de la SEQ ID NO: 1 o 9, el segundo fragmento tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 7 hasta la posición 14 de SEQ ID NO: 1 o 9, y el péptido protegido producido por acoplamiento del primer y segundo fragmentos tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 7 hasta la posición 16 de SEQ ID NO: 1 o 9. En una realización, el procedimiento de la invención incluye además la desprotección de un grupo amino de la unidad de aminoácido en la posición 7 del péptido protegido que tiene la secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 7 hasta la posición 16 de la SEQ ID NO: 1 o 9 para la producción de un péptido reactivo en la posición-7. En una realización, el procedimiento de la invención incluye además proporcionar un tercer fragmento que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición 6 de la SEQ ID NO: 1 o 9, en el que el tercer fragmento está protegido excepto para un grupo carboxilo del aminoácido en la posición 6. En una realización, el procedimiento incluye además el acoplamiento del tercer fragmento y el péptido reactivo en la posición-7 a través de una síntesis en fase de solución para la producción de un péptido lineal protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición 16 de SEQ ID NO: 1 o 9. En una realización, el procedimiento incluye además la desprotección del péptido lineal protegido para la producción de un péptido lineal desprotegido. En una realización, el procedimiento comprende además la oxidación del péptido lineal desprotegido para la producción del péptido que tiene la secuencia agonista de GCC de SEQ ID NOs: 1 o 9.

25 En una realización, cada uno del primer y segundo fragmentos no tiene más de 10 unidades de aminoácidos de longitud (por ejemplo, 2-10 unidades de aminoácidos de longitud, 3-9 unidades de aminoácidos de longitud, o 4-8 unidades de aminoácidos de longitud).

30 En una realización, el segundo fragmento tiene la segunda secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición j-1 de la secuencia agonista de GCC y ya sea una o ambas de la unidad de aminoácidos del segundo fragmento en la posición j-1 y la unidad de aminoácidos del primer fragmento en la posición k se selecciona del grupo que consiste en glicina, prolina, leucina, alanina y arginina. En una realización, al menos una de las unidades de aminoácidos en las posiciones j-1 y k es ya sea glicina o prolina.

35 En una realización, el segundo fragmento tiene la tercera secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición k+1 hasta la posición m de la secuencia agonista de GCC y ya sea una o ambas de la unidad de aminoácidos del tercer fragmento en la posición m y la unidad de aminoácidos del primer fragmento en la posición k se selecciona del grupo que consiste en glicina, prolina, leucina, alanina y arginina. En una realización, al menos una de las unidades de aminoácidos en las posiciones m y k es glicina o prolina.

40 En una realización, k es n. En una realización, el segundo fragmento tiene la segunda secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición j-1 de la secuencia agonista de GCC, y la unidad de aminoácidos en las posiciones j-1 se selecciona del grupo que consiste en glicina, prolina, leucina, alanina y arginina. En una realización, la unidad de aminoácido en la posición j-1 es ya sea glicina o prolina. En una realización, el procedimiento de la invención comprende además la desprotección de un grupo amino de la unidad de aminoácidos en la posición h del péptido protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición k de la secuencia agonista de GCC para la producción de un péptido reactivo en la posición h. En una realización, el procedimiento comprende además proporcionar un cuarto fragmento que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición h-1 de la secuencia agonista de GCC, en el que el cuarto fragmento está protegido excepto para un grupo carboxilo de la unidad de aminoácidos en la posición h-1. En una realización, el cuarto fragmento no tiene más de 10 unidades de aminoácidos de longitud (por ejemplo, 2-10 unidades de aminoácidos de longitud, 3-9 unidades de aminoácidos de longitud, o 4-8 unidades de aminoácidos de longitud). En una realización, el procedimiento incluye además el acoplamiento del cuarto fragmento y el péptido reactivo en la posición h a través de una síntesis en fase de solución para la producción de un péptido lineal protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición n de la secuencia agonista de GCC. En una realización, el procedimiento comprende además la desprotección del péptido lineal protegido para la producción de un péptido lineal desprotegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición n de la secuencia agonista de GCC. En una realización, el procedimiento de la invención comprende además la oxidación del péptido lineal desprotegido para la producción del péptido que comprende la secuencia agonista de GCC seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-44 y 99-107.

Al menos uno de los fragmentos del péptido de interés (por ejemplo, el primer, segundo, tercero y/o cuarto fragmentos) se proporciona a través de una síntesis de péptidos en fase sólida. En una realización, la síntesis de péptidos en fase sólida es una síntesis en fase sólida de Fmoc. En una realización, la síntesis en fase sólida de

Fmoc se realiza en resina de 2-clorotritilo, tales como las que tienen 1% de DVB y una velocidad de sustitución que varía desde 0.3 mmol/g a 1.2 mmol/g (por ejemplo, 0.9-1.1 mmol/g).

5 Los procedimientos de esta invención producen inesperadamente péptidos agonistas de GCC de alta pureza (por ejemplo, > 96%) a altos rendimientos (por ejemplo, > 14%) en comparación con la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) paso a paso convencional, donde el rendimiento global de los péptidos que tienen un nivel de pureza del 96% es aproximadamente del 5%. El procedimiento de condensación de fragmentos (esto es, el procedimiento en solución híbrida y en fase sólida) de esta invención también requiere mucho menos tiempo para sintetizar péptidos de GCC que SPPS convencional. Además de la rentabilidad que ofrecen los rendimientos incrementados y el tiempo reducido, el procedimiento de esta invención también es fácilmente escalable para la producción comercial.

10 También se proporcionan en este documento los péptidos, por ejemplo, péptidos agonistas de GCC, preparados mediante los procedimientos descritos en este documento.

15 En una realización, el péptido se precipita concentrando la solución del péptido eliminando agua y el alcohol al vacío sin la necesidad de añadir un éter. En otra realización, se añade un éter para facilitar la precipitación, por ejemplo, acelerando el procedimiento de precipitación.

20 En una realización, no es necesario el enjuague del péptido después de la adsorción en una columna adsorbente polimérica cuando, por ejemplo, el péptido adsorbido está sustancialmente libre de sales solubles en agua (por ejemplo, fosfatos o acetatos). En este contexto, "sustancialmente" libre de sales solubles en agua significa que el contenido de sal del péptido es preferiblemente inferior al 5%, inferior al 4.5%, inferior al 4.25%, inferior al 4%, inferior al 3.5%, inferior al 3%, inferior al 2.5%, inferior al 2%, inferior al 1.5%, inferior al 1%, inferior al 0.5%, inferior al 0.25%, o inferior al 0.1%, del peso total del péptido.

25 En una realización, la columna adsorbente polimérica comprende una resina de poliestireno. En particular, la resina se selecciona para que el péptido purificado eluido o desadsorbido no sea inferior al 80% de la cantidad de péptido adsorbida en la resina, por ejemplo, no inferior al 85%, no inferior al 90% o no inferior al 95%. En una realización, la resina está formada de poliestireno reticulado con un diámetro promedio de poro superior a 5 nm, por ejemplo, aproximadamente 6-8 nm, 10-15 nm, 15-20 nm o 25-30 nm.

30 La mezcla de solventes utilizada para la elución del péptido comprende agua, y un segundo solvente que puede formar un azeótropo con agua tal como isopropanol. Los solventes adicionales incluyen etanol, tert-butanol, 2-butanol, 1-cloro-2-propanol, 1-metoxi-2-propanol, 2-metoxi-etanol, 2-metil-2-propanol, ácido acético, acetato de metilo y acetato de propilo. Los solventes pueden ser solventes de Clase 3 (o solventes de baja toxicidad) como se define en la guía ICH. En otra realización, la mezcla de solventes utilizada para eluir comprende éter, tal como una mezcla de isopropanol/éter.

La solución acuosa de alcohol comprende isopropanol.

En una realización, el éter comprende éter dietílico o MTBE.

35 En una realización, el procedimiento incluye además intercambiar sal del péptido lavando el péptido con una solución acuosa que comprende una sal de amonio (por ejemplo, acetato de amonio), ácido acético y/o una sal de acetato (por ejemplo, acetato de sodio) antes de la purificación. En una realización, si el procedimiento incluye la etapa de intercambio de sal, el procedimiento también incluye el enjuague del péptido con agua desionizada después de la adsorción en la columna de resina polimérica para desalar el péptido.

40 En una realización, el procedimiento incluye además liofilizar el péptido después de la etapa de intercambio de sal antes de la purificación.

En una realización, el procedimiento incluye además secar del péptido precipitado después de añadir el éter, por ejemplo, a presión reducida.

45 En una realización, el péptido purificado se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 8 y 9. Preferiblemente, el péptido purificado es SEQ ID NO: 1 o 9.

50 Los procedimientos de purificación de esta invención producen inesperadamente péptidos agonistas de GCC de alta pureza (por ejemplo, > 96%) y altas densidades aparente y/o a granel (por ejemplo, > 0.3 g/mL) en comparación con procedimientos de purificación convencionales tales como liofilización, donde las densidades aparente y/o a granel del purificado son aproximadamente 10 veces menores que las de los péptidos purificados por los procedimientos de esta invención. El procedimiento de purificación de esta invención también requiere mucho menos tiempo que la liofilización convencional, que puede conducir potencialmente a reducciones en el contenido de topoisómeros, productos de degradación de desamidación y otras impurezas. El procedimiento de purificación de esta invención también es fácilmente escalable para producción comercial en comparación con la liofilización convencional.

En otro aspecto más, los péptidos, por ejemplo, péptidos agonistas de GCC, purificados mediante el procedimiento descrito en este documento pueden tener una o más de las siguientes características.

5 En una realización, el péptido purificado tiene una densidad aparente no inferior al 0.05 g/mL, no inferior al 0.1 g/mL, no inferior al 0.2 g/mL, no inferior al 0.3 g/mL, no inferior al 0.4 g/mL, o no inferior al 0.5 g/mL. Por ejemplo, el péptido purificado tiene una densidad aparente que oscila entre 0.05 g/mL y 2 g/mL.

En una realización, el péptido purificado tiene una densidad aparente no inferior al 0.08 g/mL, no inferior al 0.1 g/mL, no inferior al 0.15 g/mL, no inferior al 0.2 g/mL, no inferior al 0.3 g/mL, no inferior al 0.4 g/mL, no inferior al 0.5 g/mL, o no inferior al 0.6 g/mL. Por ejemplo, el péptido purificado tiene una densidad a granel que oscila entre 0.08 g/mL y 2 g/mL.

10 En una realización, el péptido purificado tiene una pureza cromatográfica no inferior al 96%, no inferior al 97%, o no inferior al 98%. Por ejemplo, el péptido agonista de GCC tiene un contenido de impurezas cromatográficas no superior al 4%, no superior al 3.5%, no superior al 3%, no superior al 2.5%, no superior al 2%, no superior al 1.5%, o no superior al 1%. El contenido de impurezas cromatográficas se determina como porcentajes de área total de impurezas por HPLC. El contenido de impurezas cromatográficas incluye contenido de topoisómero. Las impurezas
15 no incluyen ningún excipiente farmacéuticamente aceptable usado para la formulación de fármacos.

En una realización, el péptido purificado está sustancialmente libre de contaminantes resultantes del procedimiento de preparación de péptidos, tales como solventes orgánicos usados en el procedimiento, por ejemplo, amonio, acetronitrilo, acetamida, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol o isopropanol), TFA, éter u otros contaminantes. En este contexto, "sustancialmente" libre de contaminantes significa que el contenido contaminante del péptido al final
20 del procedimiento de purificación es preferiblemente inferior al 0.5%, inferior al 0.3%, inferior al 0.25%, inferior al 0.1%, inferior al 0.05%, inferior al 0.04%, inferior al 0.03%, inferior al 0.02%, inferior al 0.01%, inferior al 0.005%, inferior al 0.003%, o inferior al 0.001% del peso total del péptido. Por ejemplo, el péptido purificado contiene <0.01% de acetamida, <0.3% de ion amonio, <0.01% de acetronitrilo, y/o <0.1% de TFA. El contenido de contaminantes se puede determinar por procedimientos convencionales tales como cromatografía de gases. Preferiblemente, los
25 solventes residuales en el péptido purificado de la invención son menores que los límites establecidos en las directrices ICH, por ejemplo, IMPURITIES: GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS Q3C(R5) (disponible en http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Step4/Q_3C_R5_Step4.pdf). Por ejemplo, el péptido purificado contiene <410 ppm de acetronitrilo (por ejemplo, ≤40 ppm o ≤20 ppm), <5000 ppm de etanol (por ejemplo, ≤140 ppm), <5000 ppm de isopropanol, <5000 ppm de acetato de etilo (por ejemplo, ≤20 ppm), <3000 ppm de metanol (por ejemplo, ≤250 ppm), <5000 ppm de MTBE (por ejemplo, ≤20 ppm), <290 ppm de hexano y/o <5000 ppm de heptano o pentano.
30

En una realización, el péptido purificado está sustancialmente libre de topoisómeros. En este contexto, "sustancialmente" libre de topoisómeros significa que el contenido de topoisómero del péptido al final del procedimiento de purificación es preferiblemente inferior al 2%, inferior al 1.5%, inferior al 1.25%, inferior al 1%, inferior al 0.9%, inferior al 0.8%, inferior al 0.7%, inferior al 0.6%, inferior al 0.5%, inferior al 0.4%, inferior al 0.3%, inferior al 0.2%, o inferior al 0.1%, del peso total del péptido.
35

En una realización, el péptido purificado está sustancialmente libre de agua. En este contexto, "sustancialmente" libre de agua significa que el contenido de agua del péptido al final del procedimiento de purificación es preferiblemente inferior al 7%, inferior al 6%, inferior al 5%, inferior al 4.5%, inferior al 4.25%, inferior al 4%, inferior al 3.5%, inferior al 3%, inferior al 2.5%, inferior al 2%, inferior al 1.5%, inferior al 1%, inferior al 0.5%, inferior al 0.25%, o inferior al 0.1%, del peso total del péptido.
40

En una realización, el péptido purificado incluye la secuencia agonista de GCC de SEQ ID NO: 1.

En una realización, el péptido purificado incluye la secuencia agonista de GCC de SEQ ID NO: 9.

45 La invención también se refiere a una formulación (por ejemplo, una formulación oral) que contiene los péptidos preparados y/o purificados mediante los procedimientos descritos en este documento y en particular, una formulación de dosis baja que contiene 0.05-10 mg (por ejemplo, 0.1 mg, 0.3 mg o 0.5 mg) de los péptidos purificados. La formulación de dosis baja puede tener adicionalmente una o más características adicionales como se describe en PCT/US201 1/051805 y se puede preparar mediante los procedimientos descritos en este documento, tales como la mezcla en seco.

50 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra la distribución del tamaño de partícula por análisis de cribado para plecanatida liofilizada y plecanatida precipitada.

La figura 2 es una imagen microscópica óptica de plecanatida liofilizada.

La figura 3 es una imagen microscópica óptica de plecanatida precipitada.

Descripción detallada

5 La invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas, proporciona procedimientos de preparación de péptidos, por ejemplo, agonistas de péptidos GCC, en particular un procedimiento de solución híbrida y fase sólida. El procedimiento de la invención incluye proporcionar dos o más fragmentos de un péptido de interés a través de síntesis en fase sólida o en fase sólida y en fase de solución y acoplarlos a través de una síntesis en fase de solución para obtener el péptido diana. El procedimiento puede incluir, además, si es necesario, la ciclación oxidativa de residuos de aminoácidos de cisteína de un péptido lineal formado por el acoplamiento de fragmentos para la producción de un péptido ciclado.

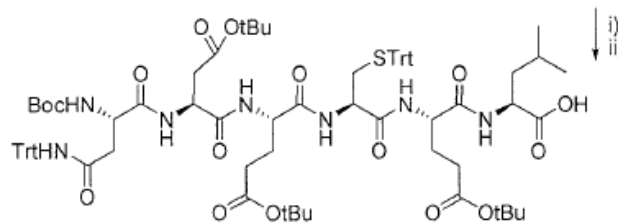
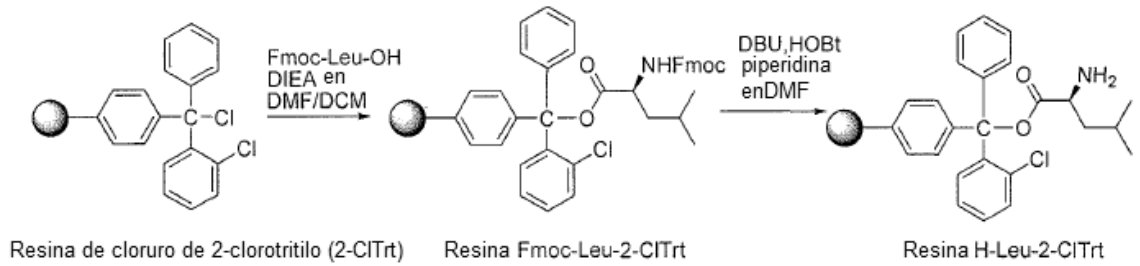
10 Los fragmentos descritos anteriormente se pueden preparar por técnicas de síntesis de péptidos en fase de solución estándar o síntesis de péptidos en fase sólida en las que se produce un enlace peptídico a través de la condensación directa del grupo amino (esto es, NH₂) de un primer aminoácido con el grupo carboxi (esto es, COOH) de un segundo aminoácido con la eliminación de una molécula de agua. Al menos uno de los fragmentos se prepara mediante síntesis de péptidos en fase sólida.

15 La síntesis del enlace peptídico por condensación directa, como se formuló anteriormente, requiere la supresión del carácter reactivo del grupo amino del primer y del grupo carboxilo del segundo aminoácido. Los sustituyentes enmascarantes (esto es, grupos protectores) deben permitir su eliminación inmediata, sin inducir la degradación de la molécula peptídica lábil. El término "péptido protegido" o "fragmento de péptido protegido" se refiere a un fragmento de péptido o péptido, en el que todos los grupos reactivos en sus aminoácidos constituyentes están enmascarados por grupos protectores, a menos que se especifique lo contrario. El término "péptido desprotegido" o "fragmento de péptido desprotegido" se refiere a un péptido o fragmento de péptido, en el que todos los grupos reactivos en sus aminoácidos constituyentes están libres de ser enmascarados por grupos protectores, a menos que se especifique lo contrario. El término "grupos reactivos" se refiere a los grupos que forman el enlace peptídico y aquellos que interfieren con la formación del enlace peptídico, tales como grupos amino, carboxilo, hidroxilo y tiol (como en cisteína). Los ejemplos de grupos protectores para amino incluyen y no están limitados a 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), tert-butoxicarbonilo (Boc), benzilo (Bz), acetilo (Ac) y bencilo (Bn). Los ejemplos de grupos protectores para carboxilo incluyen tritilo (trifenilmetilo, Trt) y O-tert-butilo (OtBu). Los ejemplos de grupos protectores para tiol incluyen acetamidometilo (Acm), tert-butilo (tBu), 3-nitro-2-piridina sulfenilo (NPYS), 2-piridina-sulfenilo (Pyr) y tritilo (Trt). Se describen ejemplos adicionales de grupos protectores en Greene, T.W., Wuts, P.G. M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999.

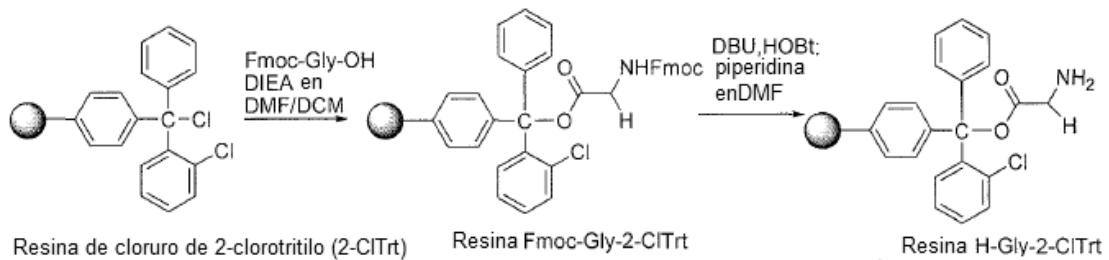
20 En una realización preferida, los procedimientos de la invención se usan para preparar SP-304 (plecanatida). En particular, se preparan tres fragmentos de péptidos, A, B y C, y luego se ensambla una secuencia peptídica lineal mediante la condensación de los fragmentos A, B y C de la siguiente manera: preparación del fragmento A, Boc-Asn(Trt)-Asp(OtBu)-Glu(Ot-Bu)-Cys(Trt)-Glu(OtBu)-Leu-OH, por fase sólida a partir de resina de cloruro de 2-cloro-tritilo; preparación del fragmento B, Fmoc-Cys(Acm)-Val-Asn-Val-Ala-Cys(Trt)-Thr(tBu)-Gly-OH, por fase sólida a partir de resina de cloruro de 2-cloro-tritilo; preparación del fragmento C, Cys(Acm)-Leu-OtBu, mediante síntesis en fase de solución, el acoplamiento de los fragmentos B y C en fase de solución para la producción del fragmento B-C, y el acoplamiento de los fragmentos A y B-C para la producción del péptido lineal A-B-C.

35 Los fragmentos A protegidos con cadena lateral (BocAA1-6OH) y B (FmocAA7-14OH) se pueden preparar mediante SPPS de Fmoc usando la resina de cloruro de 2-cloro-tritilo sensible a los ácidos (2-ClTrt) y derivados de aminoácidos protegidos con Fmoc, como se muestra en el esquema 1 a continuación.

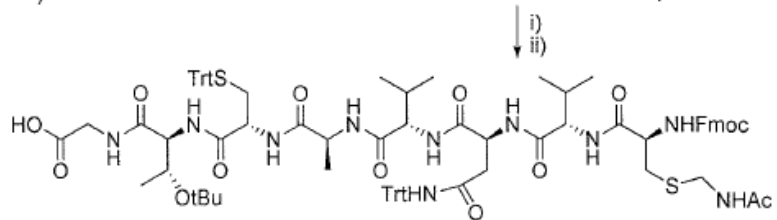
Esquema 1



Boc-Asn(Trt)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Cys(Trt)-Glu(OtBu)-Leu-OH, (Fragmento A o BocAA1-6OH)



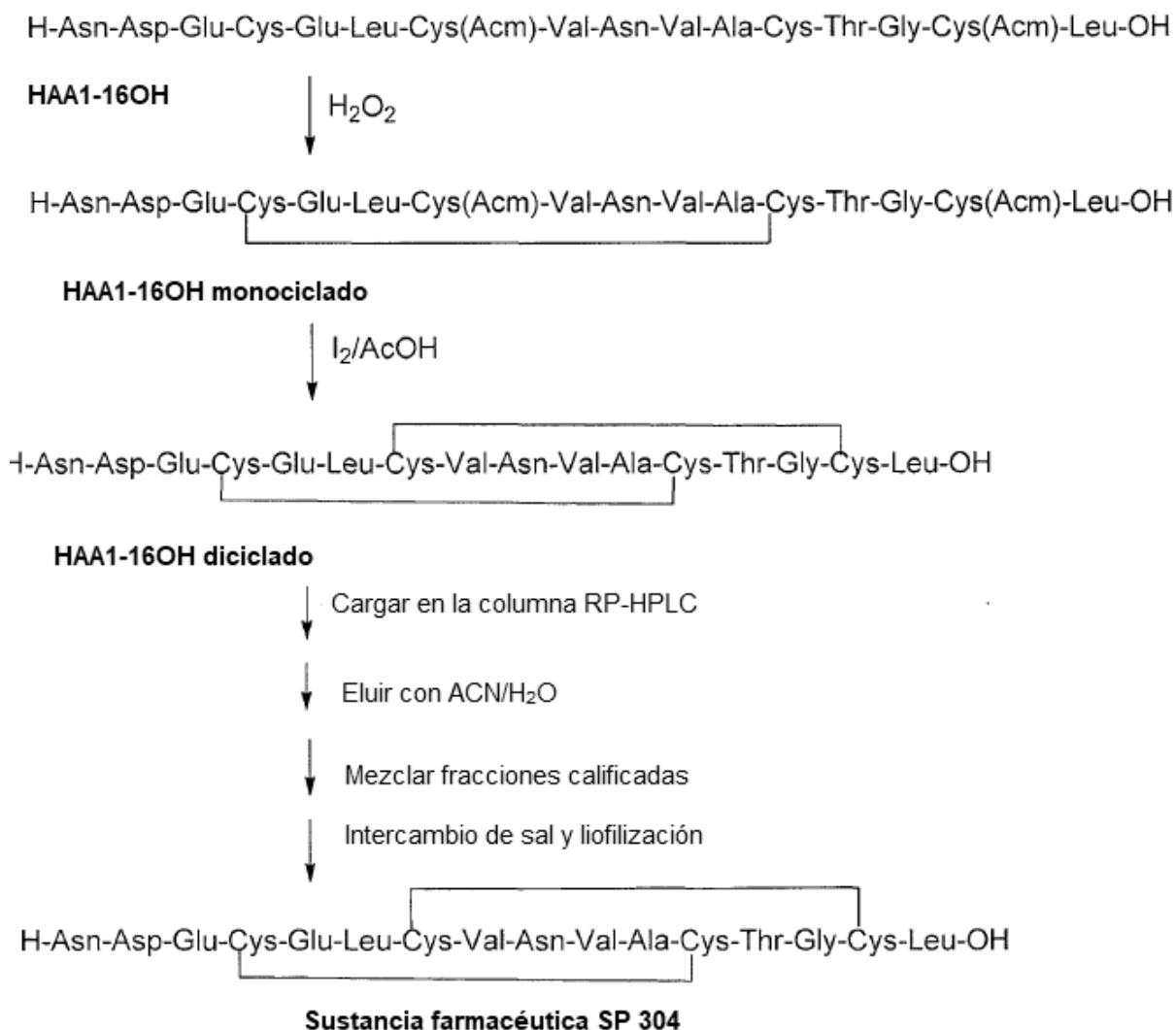
i) Ensamblaje de cadena de péptidos usando química de Fmoc
ii) 1%TFA/DCM



Fmoc-Cys(Acm)-Val-Asn(Trt)-Val-Ala-Cys(Trt)-Thr(tBu)-Gly-OH, (Fragmento B o FmocAA7-14OH)

5 El fragmento C (HAA15-16OtBu) se puede preparar mediante la síntesis en fase de solución y luego acoplarse al fragmento B (FmocAA7-14OH) en fase de solución para dar el fragmento B-C (FmocAA7-16OtBu). El grupo protector Fmoc puede luego eliminarse del fragmento BC (FmocAA7-16OtBu) para dar HAA7-16OtBu, que luego se acopla al fragmento A (BocAA1-6OH) para la producción del SP-304 lineal protegido de cadena lateral (BocAA1-16OtBu), como se muestra en el esquema 2 a continuación.

Esquema 4



5 A continuación, la solución de SP-304 dicitado en bruto se puede purificar y concentrar, como se muestra en el esquema 3 anterior, cargando la solución en una resina adsorbente poliestirénica (por ejemplo, D101 (Anhui Sanxing (China); poliestireno reticulado; área de superficie 500-550 m²/g; diámetro promedio de poro: 9-10 nm; volumen de poro: 1.18-1.24 mL/g; densidad aparente: 0.65-0.70 g/mL; densidad a granel: 1.03-1.07 g/mL; humedad: 67- 75%; tamaño de partícula: 0.315 ~ 1.25 mm ≥ 95%; diámetro efectivo: 0.4 ~0.7 mm; coeficiente de uniformidad: ≤1.6%), columna DA201C, DA201H, ADS-8, y ADS-5), eluyendo el SP-304 dicitado de la columna con un eluyente (por ejemplo, una solución acuosa de etanol al 90%), concentrando la solución de SP-304 recogida a presión reducida, y precipitando SP-304 con metil-t-butil-éter (MTBE). A continuación, el precipitado se puede recoger por filtración o

10 centrifugación, se seca a alto vacío para dar SP-304 en forma sólida.

Como se ilustra en el esquema 4 anterior, la solución de SP-304 dicitado en bruto también se puede purificar directamente en una columna de HPLC C18 preparativa con acetonitrilo (ACN), metanol y/o agua en diversos sistemas de solución reguladora. El SP-304 dicitado en bruto también se puede purificar a través de otros procedimientos conocidos para los expertos en el arte.

15 Los expertos en el arte reconocerán que, en la síntesis en fase sólida, las reacciones de desprotección y de acoplamiento se deben completar y los grupos bloqueadores de cadena lateral deben ser estables durante toda la síntesis.

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

5 En la síntesis en fase de solución, se puede usar una amplia variedad de procedimientos de acoplamiento y grupos protectores (Véase, Gross and Meienhofer, eds., "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology," Vol. 1-4 (Academic Press, 1979); Bodansky and Bodansky, "The Practice of Peptide Synthesis," 2d ed. (Springer Verlag, 1994)). Además, son posibles la purificación intermedia y la ampliación lineal. Los expertos en el arte apreciarán que la síntesis de solución requiere la consideración de los grupos protectores de la cadena principal y de la cadena lateral y el procedimiento de activación. Además, la selección cuidadosa de los fragmentos es necesaria para minimizar la racemización durante la condensación del fragmento. Por ejemplo, la racemización se minimiza cuando los fragmentos contienen Gly o Pro C-terminal. Las consideraciones de solubilidad también son un factor. La síntesis de péptidos en fase sólida utiliza un polímero insoluble para el soporte durante la síntesis orgánica. La cadena peptídica soportada por polímero permite el uso de etapas de lavado y filtración simples en lugar de purificaciones laboriosas en etapas intermedias. La síntesis de péptidos en fase sólida generalmente se puede realizar de acuerdo con el procedimiento de Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc., 1963, 85:2149, que implica ensamblar una cadena peptídica lineal en un soporte de resina usando aminoácidos protegidos. La síntesis de péptidos en fase sólida por lo general utiliza ya sea la estrategia Boc o Fmoc, ambas son bien conocidas en la técnica.

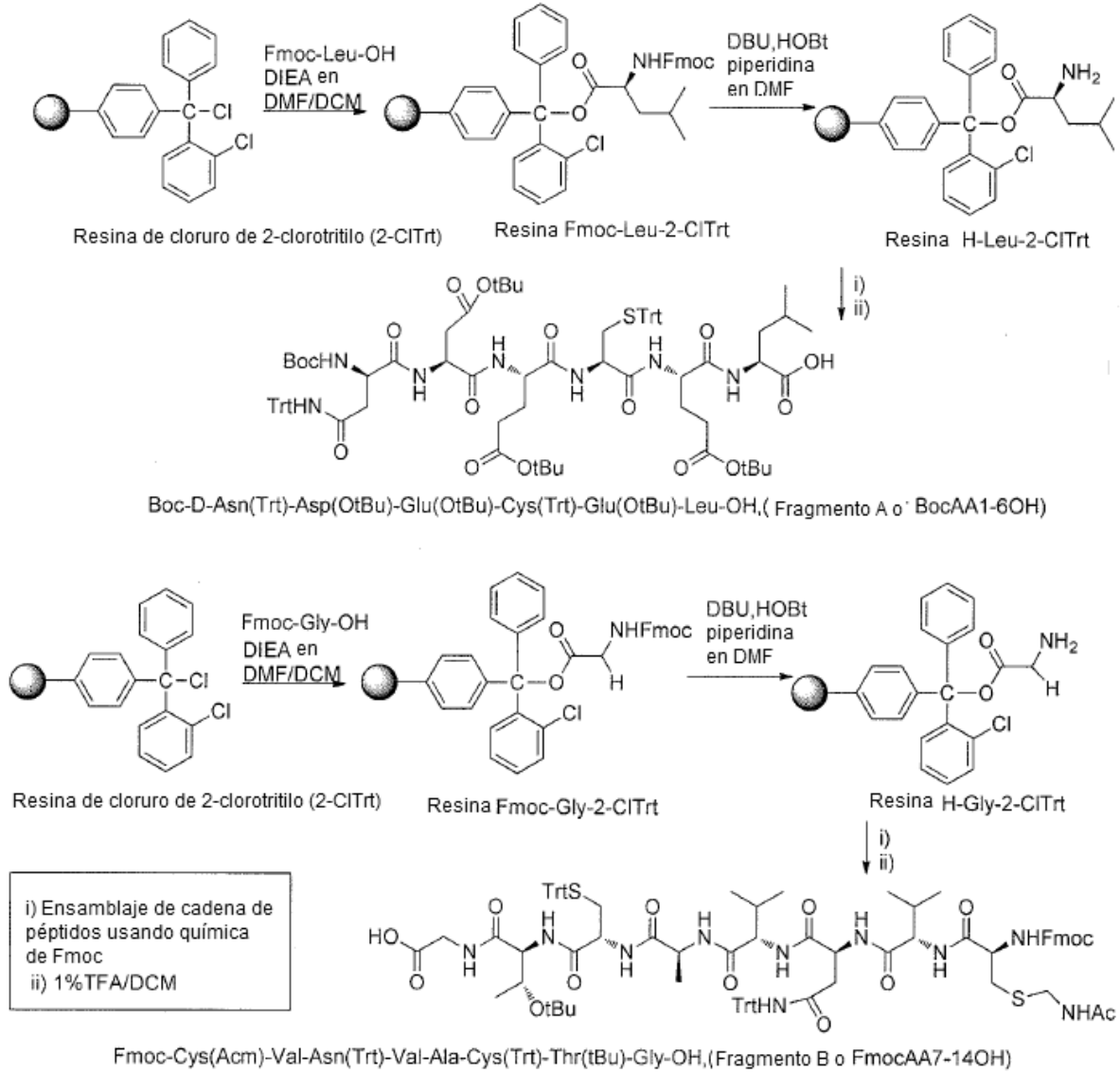
20 Los procedimientos de la presente invención se pueden usar para preparar cualquier agonista de GCC basado en péptidos conocido en la técnica, tal como análogos de uroguanilina, guanilina, linfoguanilina, linaclotida, péptidos ST, SP-304 y SP-333. Los ejemplos no limitantes de tales análogos de uroguanilina, guanilina, linfoguanilina, linaclotida, SP-304, SP-333 y péptidos ST bacterianos se describen en la sección 1.1 a continuación. En ciertas realizaciones, los procedimientos se usan para preparar un péptido que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOS: 1-44 y 99-107. En una realización preferida, el péptido así formado consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOS: 1, 8 y 9. El término "consiste esencialmente en" se refiere a un péptido que es idéntico al péptido de referencia en su secuencia de aminoácido o a un péptido que no difiere sustancialmente en términos de ya sea la estructura o la función del péptido de referencia. Un péptido difiere sustancialmente del péptido de referencia si su secuencia de aminoácidos primaria varía en más de tres aminoácidos del péptido de referencia o si su activación de la producción de cGMP celular se reduce en más del 50% en comparación con el péptido de referencia. Preferiblemente, los péptidos sustancialmente similares difieren en no más de dos aminoácidos y no en más de aproximadamente 25% con respecto a la activación de la producción de cGMP. En realizaciones preferidas, el agonista de GCC preparado por los procedimientos de la invención es un péptido que comprende al menos 12 residuos de aminoácidos, y más preferiblemente que comprende entre 12 y 26 aminoácidos.

35 En otra realización, el procedimiento de la invención se usa para preparar SP-353, que es un análogo de péptido ST bacteriano. La estrategia general para la síntesis híbrida de SP-353 incluye síntesis en fase sólida y fase de solución para la producción de fragmentos de péptidos apropiados (véanse los esquemas 5 y 6, a continuación), condensación de segmentos posteriores para formar el péptido en bruto lineal (véase el esquema 7, a continuación) y plegamiento oxidativo natural para formar el producto final ciclado (véase el esquema 7, a continuación). La misma estrategia también se puede usar para la producción de otros análogos de péptidos ST (tales como SP-354, linaclotida, etc.) de secuencias de aminoácidos similares que se muestran en la tabla II.

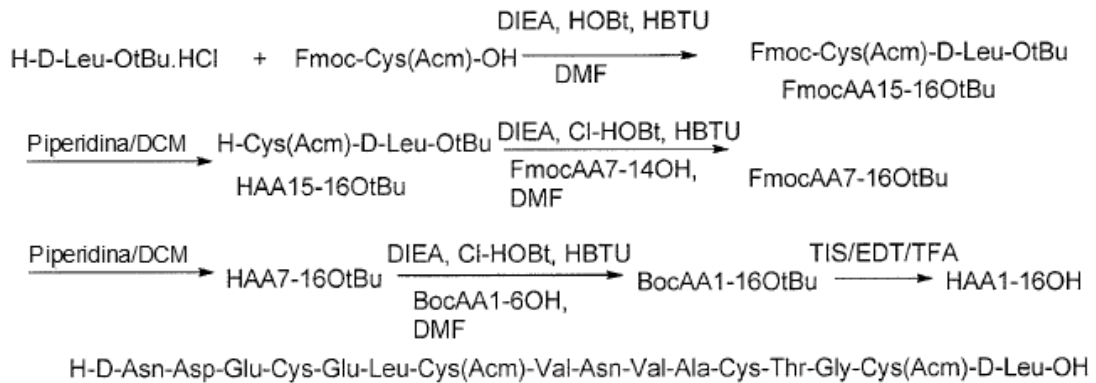
40

el péptido en bruto lineal (véase el esquema 9 a continuación), plegamiento oxidativo para formar el producto final ciclado, la purificación y la liofilización (véase el esquema 10, a continuación).

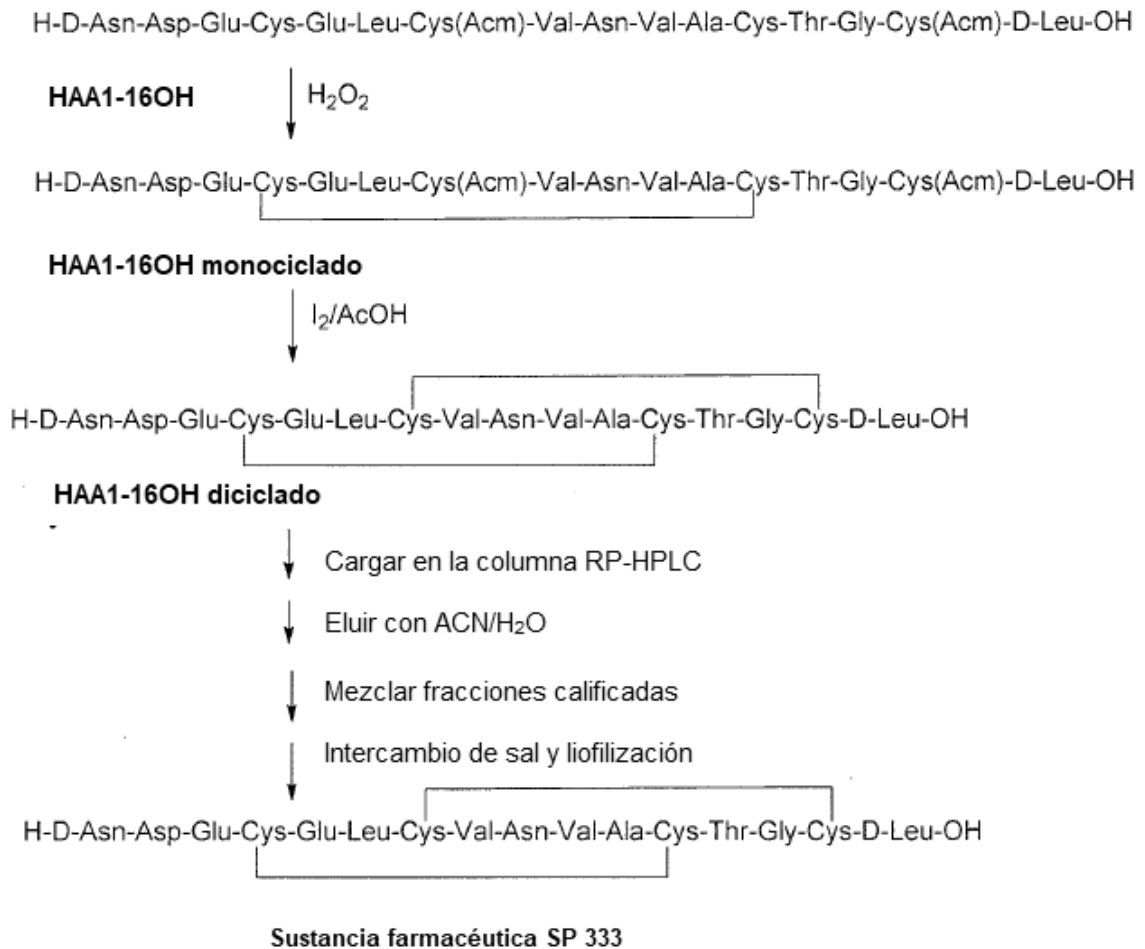
Esquema 8



Esquema 9



Esquema 10

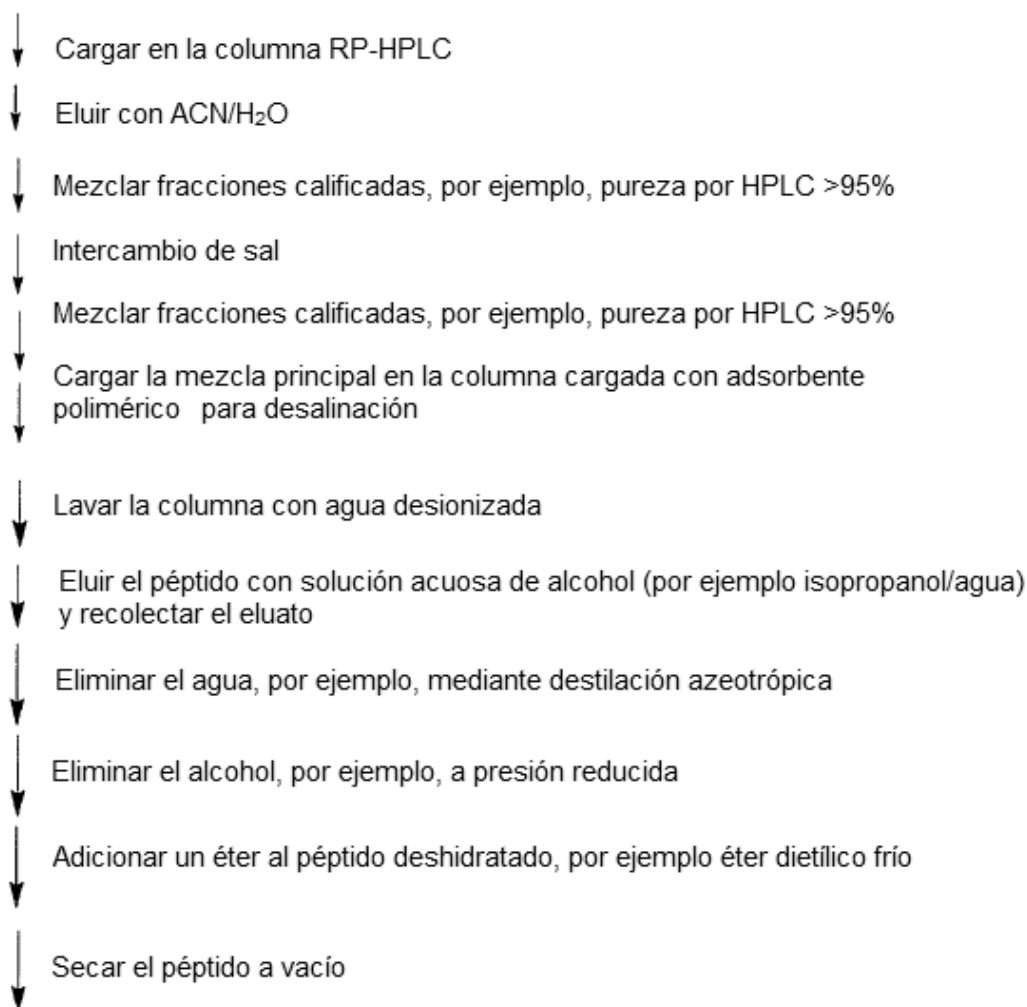


5 En otro aspecto, la invención también proporciona un procedimiento de péptidos purificadores, por ejemplo, agonistas de péptidos GCC. La estrategia general para purificar péptidos, que incluye aquellos sintetizados por los procedimientos híbridos descritos en este documento, incluye, por ejemplo, las etapas ilustradas en el esquema 11, a continuación. Se entiende que ciertas etapas en el esquema 11 se pueden repetir (por ejemplo, enjuagando la

columna con agua desionizada) o ausentes (por ejemplo, intercambio de sal o eliminación de alcohol después de la deshidratación) para optimizar el procedimiento de purificación.

Esquema 11

Péptido, por ejemplo, SP-304 o SP-333 diciclado



Péptido purificado para otro procedimiento de fabricación del fármaco

5 En otro aspecto más, esta invención proporciona un péptido purificado, por ejemplo, agonistas peptídicos de GCC, purificados por el procedimiento de precipitación descrito en este documento. Preferiblemente, el péptido purificado es SP-304 (SEQ ID NO: 1) o SP-333 (SEQ ID NO: 9). En una realización, el SP-304 o SP-333 purificado tiene una densidad aparente no inferior al 0.05 g/mL, no inferior al 0.1 g/mL, no inferior al 0.2 g/mL, no inferior al 0.3 g/mL, no inferior al 0.4 g/mL, o no inferior al 0.5 g/mL. En una realización preferida, el SP-304 o SP-333 purificado tiene una densidad aparente de aproximadamente 0.05-2 g/mL, aproximadamente 0.2-0.7 g/mL, aproximadamente 0.3-0.6 g/mL, o aproximadamente 0.4-0.5 g/mL. En una realización, el SP-304 o SP-333 purificado tiene una densidad a granel no inferior al 0.08 g/mL, no inferior al 0.1 g/mL, no inferior al 0.15 g/mL, no inferior al 0.2 g/mL, no inferior al 0.3 g/mL, no inferior al 0.4 g/mL, no inferior al 0.5 g/mL, o no inferior al 0.6 g/mL. Por ejemplo, el SP-304 o SP-333 purificado tiene una densidad a granel de 0.08-2 g/mL, aproximadamente 0.4-0.9 g/mL, aproximadamente 0.5-0.8 g/mL, o aproximadamente 0.6-0.7 g/mL. En una realización, el péptido SP-304 o SP-333 purificado contiene <0.01% de acetamida (por ejemplo, <28ppm), <0.3% de ion amonio (por ejemplo, <0.25%), <0.01% de acetonitrilo (por ejemplo, <20 ppm), y/o <0.1% de TFA (por ejemplo, <0.09%). En una realización, el péptido SP-304 o SP-333 purificado tiene una densidad aparente de 0.4-0.5 g/mL, tiene una densidad aparente de 0.6-0.7 g/mL y contiene <0.01% de acetamida (por ejemplo, <28 ppm), <0.3% de iones de amonio (por ejemplo, <0.25%), <0.01% de acetonitrilo (por ejemplo, <20 ppm) y/o <0.1% de TFA (por ejemplo, ≤0.09%).

1.1 agonistas de GCC

Los agonistas de GCC preparados por los procedimientos de la invención se pueden unir a la guanilato ciclasa C y estimular la producción intracelular de cGMP. Opcionalmente, los agonistas de GCC inducen apoptosis e inhiben la proliferación de células epiteliales. El término "guanilato ciclasa C" se refiere a una forma transmembrana de guanilato ciclasa que actúa como receptor intestinal de los péptidos de toxinas termoestables (ST) secretados por bacterias entéricas. La guanilato ciclasa C también es el receptor de los péptidos de origen natural guanilina y uroguanilina. No se ha excluido la posibilidad de que haya diferentes receptores para cada uno de estos péptidos. Por consiguiente, el término "guanilato ciclasa C" también puede abarcar una clase de receptores de guanilato ciclasa transmembrana expresados en células epiteliales que recubren la mucosa gastrointestinal.

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

1.1.1 Péptidos agonistas de GCC

Los agonistas de GCC preparados por los procedimientos de la invención son preferiblemente péptidos. En algunas realizaciones, el péptido agonista de GCC tiene menos de 30 aminoácidos de longitud. En realizaciones particulares, el péptido agonista de GCC tiene una longitud inferior o igual a 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10 o 5 aminoácidos. Los ejemplos de péptidos agonistas de GCC para usar en las formulaciones y procedimientos de la invención incluyen los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,879,802 y 8,034,782, y las Publicaciones de los Estados Unidos Nos. US 2010-0069306 y US 2010-0120694.

Los ejemplos específicos de péptidos agonistas de GCC que se pueden preparar mediante los procedimientos de la invención incluyen los descritos en las tablas I-VII a continuación. Como se usa en las tablas I-VII, los términos "PEG3" o "3PEG" se refieren a un polietilenglicol tal como ácido aminoetiloxi-etiloxi-acético (AeeA) y polímeros de los mismos. El término "Xaa" se refiere a cualquier aminoácido natural o no natural o análogo de aminoácido. El término "Maa" se refiere a una cisteína (Cys), penicilamina (Pen), homocisteína o 3-mercaptoprolina. El término "Xaa_{n1}" está destinado a indicar una secuencia de aminoácidos de cualquier aminoácido natural o no natural o análogo de aminoácido que tiene uno, dos o tres residuos de longitud; Xaa_{n2} está destinado a indicar una secuencia de aminoácidos que tiene cero o un residuo de longitud; y Xaa_{n3} está destinado a indicar una secuencia de aminoácidos que tiene cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de longitud. Además, cualquier aminoácido representado por Xaa, Xaa_{n1}, Xaa_{n2} o Xaa_{n3} puede ser un L-aminoácido, un D-aminoácido, un aminoácido metilado o cualquier combinación de los mismos. Opcionalmente, cualquier péptido agonista de GCC representado por las fórmulas I a XX en las tablas puede contener uno o más residuos de polietilenglicol en el extremo N, el extremo C o ambos.

En ciertas realizaciones, un agonista de GCC preparado mediante los procedimientos de la invención comprende un péptido seleccionado de SEQ ID NOS: 1-44 y 99-107, cuyas secuencias se exponen a continuación en las tablas I a VII a continuación. En una realización, un agonista de GCC preparado mediante los procedimientos de la invención comprende el péptido designado por SEQ ID NOS: 1, 8 o 9.

En ciertas realizaciones, un agonista de GCC preparado por los procedimientos de la invención comprende un péptido que es sustancialmente equivalente a un péptido seleccionado de SEQ ID NOS: 1-44 y 99-107. El término "sustancialmente equivalente" se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos equivalente a la del dominio de unión donde ciertos residuos se pueden eliminar o reemplazar con otros aminoácidos sin afectar la capacidad del péptido de unirse a un receptor de guanilato ciclasa intestinal y estimular transporte de fluidos y electrolitos.

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

Los péptidos agonistas de GCC preparados mediante los procedimientos de la invención pueden ser polímeros de L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de ambos. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los péptidos son péptidos D retroinversos. El término "isómero retroinverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el que la dirección de la secuencia se invierte y la quiralidad de cada residuo de aminoácido se invierte. Véase, por ejemplo, Jameson et al., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady et al., Nature, 368, 692-693 (1994). El resultado neto de la combinación de D-enantiómeros y la síntesis inversa es que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amida se intercambian, mientras que la posición de los grupos de cadena lateral en cada carbono alfa se

conserva. A menos que se establezca específicamente lo contrario, se supone que cualquier secuencia de L-aminoácido dada puede convertirse en un péptido D retroinverso sintetizando un inverso de la secuencia para la secuencia de aminoácido nativa correspondiente.

5 Los péptidos agonistas de GCC preparados mediante los procedimientos de la invención son capaces de inducir la producción de cGMP intracelular en células y tejidos que expresan guanilato ciclasa C. En ciertas realizaciones, el péptido agonista de GCC estimula un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o más cGMP intracelular en comparación con agonistas de GCC de origen natural como uroguanilina, guanilina o péptidos ST. Opcionalmente, el péptido agonista de GCC estimula 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o más cGMP intracelular en comparación con SP-304 (SEQ ID NO: 1). En realizaciones adicionales, el péptido agonista de GCC estimula la apoptosis, por ejemplo, la muerte celular programada, o activa el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

15 En algunas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC preparados mediante los procedimientos de la invención son más estables que los agonistas de GCC de origen natural y/o SP-304 (SEQ ID NO: 1), SP-339 (linaclotida) (SEQ ID NO: 55) o SP-340 (SEQ ID NO: 56). Por ejemplo, el péptido agonista de GCC degrada 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o menos en comparación con agonistas de GCC de origen natural y/o SP-304, SP-339 (linaclotida) o SP-340. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC para uso en las formulaciones y procedimientos de la invención son más estables para la digestión proteolítica que los agonistas de GCC de origen natural y/o SP-304 (SEQ ID NO: 1), SP-339 (linaclotida) (SEQ ID NO: 55) o SP-340 (SEQ ID NO: 56). En una realización, un péptido agonista de GCC es pegilado para hacer que los péptidos sean más resistentes a la proteólisis por las enzimas del tracto gastrointestinal. En una realización preferida, el péptido agonista de GCC es pegilado con el grupo ácido aminoetiloxi-etiloxi-acético (Aeea) en su extremo C-terminal, en su extremo N-terminal, o en ambos extremos.

Los ejemplos específicos de péptidos agonistas de GCC que se pueden preparar mediante los procedimientos de la invención incluyen un péptido seleccionado del grupo designado por las SEQ ID NOs: 1-44 y 99-107.

25 En una realización de la divulgación, el péptido agonista de GCC es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las fórmulas X-XVII (por ejemplo, SEQ ID NOs: 87-98).

30 En algunas realizaciones de la divulgación, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de fórmula I, en los que al menos un aminoácido de fórmula I es un D-aminoácido o un aminoácido metilado y/o el aminoácido en la posición 16 es una serina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 16 de la fórmula I es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 16 de la fórmula I es una d-leucina o una d-serina. Opcionalmente, uno o más de los aminoácidos en las posiciones 1-3 de fórmula I son D-aminoácidos o aminoácidos metilados o una combinación de D-aminoácidos o aminoácidos metilados. Por ejemplo, Asn¹, Asp² o Glu³ (o una combinación de los mismos) de fórmula I es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferiblemente, el aminoácido en la posición Xaa⁶ de fórmula I es una leucina, serina o tirosina.

35 En realizaciones alternativas de la divulgación, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de fórmula II, en los que al menos un aminoácido de fórmula II es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferiblemente, el aminoácido indicado por Xaa_{n2} de fórmula II es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. En algunas realizaciones, el aminoácido indicado por Xaa_{n2} de fórmula II es una leucina, una d-leucina, una serina o una d-serina. Preferiblemente, el uno o más aminoácidos indicados por Xaa_{n1} de fórmula II es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferiblemente, el aminoácido en la posición Xaa⁶ de fórmula II es una leucina, una serina o una tirosina.

40 En algunas realizaciones de la divulgación, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de fórmula III, en los que al menos un aminoácido de fórmula III es un D-aminoácido o un aminoácido metilado y/o Maa no es una cisteína. Preferiblemente, el aminoácido indicado por Xaa_{n2} de fórmula III es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. En algunas realizaciones, el aminoácido indicado por Xaa_{n2} de fórmula III es una leucina, una d-leucina, una serina o una d-serina. Preferiblemente, el uno o más aminoácidos indicados por Xaa_{n1} de fórmula III es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferiblemente, el aminoácido en la posición Xaa⁶ de fórmula III es una leucina, una serina o una tirosina.

45 En otras realizaciones de la divulgación, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de fórmula IV, en los que al menos un aminoácido de fórmula IV es un D-aminoácido o un aminoácido metilado, y/o Maa es no una cisteína. Preferiblemente, Xaa_{n2} de fórmula IV es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. En algunas realizaciones, el aminoácido indicado por Xaa_{n2} de fórmula IV es una leucina, una d-leucina, una serina o una d-serina. Preferiblemente, uno o más de los aminoácidos indicados por Xaa_{n1} de fórmula IV es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferiblemente, el aminoácido denominado Xaa⁶ de fórmula IV es una leucina, una serina o una tirosina.

- En otras realizaciones de la divulgación, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de fórmula V, en los que al menos un aminoácido de fórmula V es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 16 de fórmula V es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 16 (esto es, Xaa¹⁶) de fórmula V es una d-leucina o una d-serina. Opcionalmente, uno o más de los aminoácidos en la posición 1-3 de fórmula V son D-aminoácidos o aminoácidos metilados o una combinación de D-aminoácidos o aminoácidos metilados. Por ejemplo, Asn¹, Asp² o Glu³ (o una combinación de los mismos) de fórmula V es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferiblemente, el aminoácido indicado en Xaa⁶ de fórmula V es una leucina, una serina o una tirosina.
- En realizaciones adicionales de la divulgación, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de fórmula VI, VII, VIII o IX. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 6 de fórmula VI, VII, VIII o IX es una leucina, una serina o una tirosina. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 16 de fórmula VI, VII, VIII o IX es una leucina o una serina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 16 de fórmula V es un D-aminoácido o un aminoácido metilado.
- En realizaciones adicionales de la divulgación, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de fórmula X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI o XVII. Opcionalmente, uno o más aminoácidos de las fórmulas X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI o XVII es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferiblemente, el aminoácido en el extremo carboxi de los péptidos según las fórmulas X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI o XVII es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Por ejemplo, el aminoácido en el extremo carboxi de los péptidos según las fórmulas X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI o XVII es una D-tirosina.
- Preferiblemente, el aminoácido indicado por Xaa⁶ de fórmula XIV es una tirosina, fenilalanina o una serina. Más preferiblemente, el aminoácido indicado por Xaa⁶ de fórmula XIV es una fenilalanina o una serina. Preferiblemente, el aminoácido indicado por Xaa⁴ de fórmula XV, XVI o XVII es una tirosina, una fenilalanina o una serina. Más preferiblemente, la posición del aminoácido Xaa⁴ de fórmula V, XVI o XVII es una fenilalanina o una serina.
- En algunas realizaciones de la divulgación, los péptidos de GCRA incluyen péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos de fórmula XVIII. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 1 de fórmula XVIII es un ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o lisina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 2 y 3 de fórmula XVIII es un ácido glutámico o un ácido aspártico. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 5 es un ácido glutámico. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 6 de fórmula XVIII es una isoleucina, valina, serina, treonina o tirosina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 8 de fórmula XVIII es una valina o isoleucina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 9 de fórmula XVIII es una asparagina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 10 de la fórmula XVIII es una valina o una metionina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 11 de fórmula XVIII es una alanina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 13 de fórmula XVIII es una treonina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 14 de fórmula XVIII es una glicina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 16 de fórmula XVIII es una leucina, serina o treonina. En realizaciones alternativas de la divulgación, los péptidos GCRA incluyen péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos de fórmula XIX. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 1 de fórmula XIX es una serina o asparagina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 2 de fórmula XIX es una histidina o un ácido aspártico. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 3 de fórmula XIX es una treonina o un ácido glutámico. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 5 de fórmula XIX es un ácido glutámico. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 6 de fórmula XIX es una isoleucina, leucina, valina o tirosina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 8, 10, 11 o 13 de fórmula XIX es una alanina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 9 de fórmula XIX es una asparagina o una fenilalanina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 14 de fórmula XIX es una glicina.
- En otras realizaciones de la divulgación, los péptidos de GCRA incluyen péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos de fórmula XX. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 1 de fórmula XX es una glutamina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 2 o 3 de fórmula XX es un ácido glutámico o un ácido aspártico. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 5 de fórmula XX es un ácido glutámico. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 6 de fórmula XX es treonina, glutamina, tirosina, isoleucina o leucina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 8 de fórmula XX es isoleucina o valina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 9 de fórmula XX es asparagina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 10 de fórmula XX es metionina o valina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 11 de fórmula XX es alanina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 13 de fórmula XX es una treonina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 1 de fórmula XX es una glicina. Preferiblemente, el aminoácido en la posición 15 de fórmula XX es una tirosina. Opcionalmente, el aminoácido en la posición 15 de fórmula XX tiene dos aminoácidos de longitud y es Cisteína (Cys), Penicilamina (Pen), homocisteína o 3-mercaptoprolina y serina, leucina o treonina.
- En ciertas realizaciones, uno o más aminoácidos de los péptidos agonistas de GCC se reemplazan por un aminoácido de origen no natural o un análogo de aminoácido de origen natural o no natural. Tales aminoácidos y análogos de aminoácidos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hunt, "The Non-Protein Amino Acids," in Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, Barrett, Chapman, and Hall, 1985. En algunas realizaciones, un aminoácido es reemplazado por un aminoácido de origen natural, no esencial, por ejemplo, taurina. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos de origen natural que pueden ser reemplazados por aminoácidos no proteicos incluyen los

siguientes: (1) un aminoácido aromático puede ser reemplazado por 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, 3-yodo-L-tirosina, triyodotironina, L-tiroxina, fenilglicina (Phg) o nor-tirosina (norTyr); (2) Phg y norTyr y otros aminoácidos, incluidos Phe y Tyr, se pueden sustituir por, por ejemplo, un halógeno, -CH₃, -OH, -CH₂NH₃, -C(O)H, -CH₂CH₃, -CN, -CH₂CH₂CH₃, -SH u otro grupo; (3) los residuos de glutamina pueden estar sustituidos con gamma-Hidroxi-Glu o gamma-Carboxi-Glu; (4) los residuos de tirosina pueden estar sustituidos con un aminoácido alfa sustituido tal como L-alfa-metilfenilalanina o con análogos tales como: 3-Amino-Tyr; Tyr(CH₃); Tyr(PO₃(CH₃)₂); Tyr(SO₃H); beta-Ciclohexil-Ala; beta-(1-Ciclopentenil)-Ala; beta-Ciclopentil-Ala; beta-Ciclopropil-Ala; beta-Quinolil-Ala; beta-(2-Tiazolil)-Ala; beta-(Triazol-1-il)-Ala; beta-(2-Piridil)-Ala; beta-(3-Piridil)-Ala; Amino-Phe; Fluoro-Phe; Ciclohexil-Gly; tBu-Gly; beta-(3-benzotienil)-Ala; beta-(2-tienil)-Ala; 5-Metil-Trp; y A-Metil-Trp; (5) los residuos de prolina se pueden sustituir con homopro (ácido L-pipecólico); hidroxil-Pro; 3,4-Dehidro-Pro; 4-fluoro-Pro; o alfa-metil-Pro o un análogo de aminoácido N (alfa)-C (alfa) ciclado con la estructura: n = 0, 1, 2, 3; y (6) los residuos de alanina se pueden sustituir con aminoácidos alfa-sustituidos o N-metilados, tales como ácido alfa-amino isobutírico (aib), L/Dalfa-etilalanina (L/D-isovalina), L/D-metilvalina, o L/D-alfa-metilleucina o un aminoácido no natural tal como beta-fluoro-Ala. La alanina también se puede sustituir con: n = 0, 1, 2, 3 residuos de glicina se pueden sustituir con ácido alfa-amino isobutírico (aib) o L/D-alfa-etilalanina (L/D-isovalina).

Otros ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen: un análogo no natural de tirosina; un análogo no natural de la glutamina; un análogo no natural de fenilalanina; un análogo no natural de serina; un análogo no natural de treonina; un alquilo, arilo, acilo, azido, ciano, halo, hidracina, hidracida, hidroxilo, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, sulfonilo, seleno, éster, tioácido, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, hidroxilamina, cetona o aminoácido sustituido con amino, o cualquier combinación de los mismos; un aminoácido con un reticulante fotoactivable; un aminoácido marcado con spin; un aminoácido fluorescente; un aminoácido con un nuevo grupo funcional; un aminoácido que interacciona covalente o no covalentemente con otra molécula; un aminoácido de unión a metales; un aminoácido que está amidado en un sitio que no está amidado naturalmente, un aminoácido que contiene metal; un aminoácido radioactivo; un aminoácido fotoatrapado y/o fotoisomerizable; un aminoácido que contiene biotina o análogo de biotina; un aminoácido glicosilado o modificado con carbohidrato; un aminoácido que contiene cetona; aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter; un aminoácido sustituido con átomo pesado (por ejemplo, un aminoácido que contiene deuterio, tritio, ¹³C, ¹⁵N o ¹⁸O); un aminoácido químicamente escindible o fotoescindible; un aminoácido con una cadena lateral alargada; un aminoácido que contiene un grupo tóxico; un aminoácido sustituido con azúcar, por ejemplo, una serina sustituida con azúcar o similar; un aminoácido que contiene azúcar unido a carbono; un aminoácido redox-activo; un ácido que contiene α -hidroxilo; un aminoácido que contiene amino tioácido; un aminoácido α , α disustituido; un β -aminoácido; un aminoácido cíclico distinto de prolina; una O-metil-L-tirosina; una L-3-(2-naftil) alanina; una 3-metil-fenilalanina; una p-acetil-L-fenilalanina; una O-4-alil-L-tirosina; una 4-propil-L-tirosina; una tri-O-acetil-Glc-NAc- β serina; una L-Dopa; una fenilalanina fluorada; una isopropil-L-fenilalanina; una p-azido-L-fenilalanina; una pacil-L-fenilalanina; una p-benzoil-L-fenilalanina; una L-fosfoserina; una fosfonoserina; una fosfotirosina; una p-yodo-fenilalanina; una 4-fluorofenilglicina; una p-bromofenilalanina; una p-amino-L-fenilalanina; una isopropil-L-fenilalanina; L-3-(2-naftil) alanina; D-3-(2-naftil) alanina (dNal); un análogo de fenilalanina que contiene amino, isopropilo u O-alilo; una dopa, O-metil-L-tirosina; un aminoácido glicosilado; una p-(propargiloxi) fenilalanina; dimetil-lisina; hidroxiprolina; ácido mercaptopropiónico; metil-lisina; 3-nitro-tirosina; norleucina; ácido piroglutámico; Z (Carbobenzoxilo); ϵ -Acetil-Lisina; β -alanina; derivado de aminobenzilo; ácido aminobutírico (Abu); citrulina; ácido aminohexanoico; ácido aminoisobutírico (AIB); ciclohexilalanina; d-ciclohexilalanina; hidroxiprolina; nitro-arginina; nitro-fenilalanina; nitro-tirosina; norvalina; octahidroindol carboxilato; ornitina (Orn); penicilamina (PEN); tetrahidroisoquinolina; aminoácidos protegidos con acetamidometilo y aminoácidos pegilados. Se pueden encontrar ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos en los documentos U.S. 20030108885, U.S. 20030082575, US20060019347 (párrafos 410-418) y las referencias citadas en los mismos. Los polipéptidos de la invención pueden incluir modificaciones adicionales incluyendo las descritas en el documento US20060019347, párrafo 589. Los péptidos agonistas de GCC de ejemplo incluyendo un aminoácido de origen no natural incluyen, por ejemplo, SP-368 y SP-369.

En algunas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC son péptidos cíclicos. Los péptidos cíclicos agonistas de GCC se pueden preparar por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la macrociclación se logra a menudo formando un enlace amida entre los extremos N y C del péptido, entre una cadena lateral y el extremo N o C [por ejemplo, con K₃Fe(CN)₆ a pH 8.5] (Samson et al., *Endocrinology*, 137: 5182-5185 (1996)), o entre dos cadenas laterales de aminoácidos, tales como cisteína. Véase, por ejemplo, DeGrado, *Adv Protein Chem*, 39: 51-124 (1988). En diversas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC son [4, 12; 7, 15] biciclos.

En ciertas realizaciones, uno o ambos residuos Cys que normalmente forman un enlace disulfuro en un péptido agonista de GCC se reemplazan con 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.* 2 1:117) para formar enlaces cruzados internos alternativos en las posiciones de los enlaces disulfuro normales.

En ciertas realizaciones, uno o más enlaces disulfuro en un péptido agonista de GCC se reemplazan por enlaces cruzados covalentes alternativos, por ejemplo, un enlace amida (-CH₂CH(O)NHCH₂- o -CH₂NHCH(O)CH₂-), un enlace de éster, un enlace de tioéster, un puente de lactama, un enlace de carbamoilo, un enlace de urea, un enlace

de tiourea, un enlace de éster de fosfonato, un enlace de alquilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), un enlace de alqueno (-CH₂CH = CHCH₂-), un enlace éter (-CH₂CH₂OCH₂- o -CH₂OCH₂CH₂-), un enlace de tioéter (-CH₂CH₂SCH₂- o -CH₂SCH₂CH₂-), un enlace de amina (-CH₂CH₂NHCH₂- o -CH₂NHCH₂CH₂-) o un enlace de tioamida (-CH₂C(S)NHCH₂- o -CH₂NHC(S)CH₂-). Por ejemplo, Ledu et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 100:11263-78, 2003) describen procedimientos de preparación de enlaces cruzados de lactama y amida. Péptidos agonistas de GCC de ejemplo incluyendo un puente de lactama incluyen, por ejemplo, SP-370.

En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC tienen uno o más enlaces polipeptídicos convencionales reemplazados por un enlace alternativo. Tales reemplazos pueden aumentar la estabilidad del polipéptido. Por ejemplo, la sustitución del enlace polipeptídico entre un residuo amino terminal por un residuo aromático (por ejemplo, Tyr, Phe, Trp) con un enlace alternativo puede reducir la escisión por carboxipeptidasas y puede aumentar la vida media en el tracto digestivo. Los enlaces que pueden reemplazar los enlaces polipeptídicos incluyen: un enlace retro-inverso (C(O)-NH en lugar de NH-C(O)), un enlace amida reducido (NH-CH₂), un enlace de tiometileno (S-CH₂ o CH₂-S), un enlace de oxometileno (O-CH₂ o CH₂-O), un enlace de etileno (CH₂-CH₂), un enlace de tioamida (C(S)-NH), un enlace trans-olefino (CH = CH), un enlace trans-olefino fluoro sustituido (CF = CH); un enlace de cetometileno (C(O)-CHR o CHR-C(O) en el que R es H o CH₃); y un enlace fluoro-cetometileno (C(O)-CFR o CFR-C(O) en el que R es H o F o CH₃).

En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC se modifican usando modificaciones estándar. Las modificaciones pueden ocurrir en el extremo amino (N-), carboxi (C-), internamente o una combinación de cualquiera de los precedentes. En un aspecto descrito en este documento, puede haber más de un tipo de modificación en el polipéptido. Las modificaciones incluyen, pero no están limitadas a: acetilación, amidación, biotilación, cinnamoylación, farnesilación, formilación, miristoilación, palmitoylación, fosforilación (Ser, Tyr o Thr), estearoylación, succinilación, sulfurilación y ciclación (a través de puentes disulfuro o ciclación de amidas), y modificación por Cys3 o Cys5. Los péptidos agonistas de GCC descritos en este documento también pueden ser modificados por 2, 4-dinitrofenil (DNP), DNP-lisina, modificación por 7-amino-4-metil-cumarina (AMC), fluoresceína, NBD (7-Nitrobenz-2-Oxa -1,3-Diazol), p-nitro-anilida, rodamina B, EDANS (ácido 5-((2-aminoetil) amino) naftaleno-1-sulfónico), dabcilo, dabsilo, dansilo, texas red, FMOC y Tamra (Tetrametilrodamina). Los péptidos agonistas de GCC descritos en este documento también se pueden conjugar, por ejemplo, con polietilenglicol (PEG); grupos alquilo (por ejemplo, grupos alquilo C1-C20 lineales o ramificados); unidades estructurales de ácidos grasos; combinaciones de PEG, grupos alquilo y unidades estructurales de ácido graso (véase la Patente de los Estados Unidos 6,309,633; Soltero et al., 2001 Innovations in Pharmaceutical Technology 106-110); BSA y KLH (Hemocianina de lapa californiana). La adición de PEG y otros polímeros que se pueden usar para modificar polipéptidos de la invención se describe en el documento US20060 19347 sección IX.

Un péptido agonista de GCC también puede ser un derivado de un péptido agonista de GCC descrito en este documento. Por ejemplo, un derivado incluye formas híbridas y modificadas de péptidos agonistas de GCC en los que ciertos aminoácidos han sido suprimidos o reemplazados. Una modificación también puede incluir glicosilación. Preferiblemente, cuando la modificación es una sustitución de aminoácidos, es una sustitución conservadora en una o más posiciones que se predice que son residuos de aminoácidos no esenciales para la actividad biológica del péptido. Una "sustitución conservadora" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

En una realización, un péptido agonista de GCC preparado mediante los procedimientos descritos en este documento se somete a mutagénesis aleatoria con el fin de identificar mutantes que tienen actividad biológica.

En una realización, los procedimientos de la invención se pueden usar para preparar un péptido agonista de GCC que es sustancialmente homólogo a un péptido agonista de GCC descrito en este documento. Tales péptidos sustancialmente homólogos se pueden aislar en virtud de la reactividad cruzada con anticuerpos para un péptido agonista de GCC descrito en este documento.

Se encuentran ejemplos adicionales de péptidos agonistas de GCC que se pueden preparar mediante los procedimientos de la invención en las tablas I y III a continuación. Otros péptidos GCC de la divulgación se encuentran en las tablas II, IV-VII a continuación.

1.1.2 Métodos de preparación alternativos de péptidos agonistas de GCC y sus fragmentos

Los péptidos agonistas de GCC y sus fragmentos se pueden preparar usando técnicas reconocidas en la técnica tales como la clonación molecular, la síntesis de péptidos o la mutagénesis de sitio dirigida.

Además de la síntesis convencional de péptidos en solución o en fase sólida descrita anteriormente, los péptidos agonistas de GCC o sus fragmentos se pueden producir mediante modernas técnicas de clonación. Por ejemplo, los péptidos agonistas de GCC se producen en bacterias incluyendo, sin limitación, *E. coli* o en otros sistemas existentes para la producción de polipéptidos o proteínas (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, sistemas de expresión de baculovirus que usan células de *Drosophila Sf9*, sistemas de expresión de hongos filamentosos o levaduras, sistemas de expresión de células de mamíferos), o se pueden sintetizar químicamente. Si el péptido agonista de GCC o el péptido variante ha de producirse en bacterias, por ejemplo, *E. coli*, la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido también puede codificar una secuencia líder que permita la secreción del polipéptido maduro de la célula. De este modo, la secuencia que codifica el polipéptido puede incluir la presecuencia y la prosecuencia de, por ejemplo, un polipéptido ST bacteriano de origen natural. El polipéptido maduro segregado se puede purificar del medio de cultivo.

La secuencia que codifica un péptido agonista de GCC descrito en este documento se puede insertar en un vector capaz de administrar y mantener la molécula de ácido nucleico en una célula bacteriana. La molécula de ADN se puede insertar en un vector de replicación autónoma (los vectores apropiados incluyen, por ejemplo, pGEM3Z y pcDNA3, y derivados de los mismos). El vector de ácido nucleico 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 este documento puede ser seguida por la transformación de una célula huésped tal como una bacteria. Los huéspedes bacterianos apropiados incluyen, pero no limitando a, *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Salmonella*. La construcción genética también incluye, además de la molécula de ácido nucleico que codifica, elementos que permiten la expresión, tales como una secuencia promotora y reguladora. Los vectores de expresión pueden contener secuencias de control de la transcripción que controlan la iniciación de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras.

Una variedad de secuencias de control de la transcripción es bien conocida para los expertos en el arte. El vector de expresión también puede incluir una secuencia reguladora de la traducción (por ejemplo, una secuencia 5' no traducida, una secuencia 3' no traducida, o un sitio interno de entrada al ribosoma). El vector puede ser capaz de replicación autónoma o se puede integrar en el ADN del huésped para garantizar la estabilidad durante la producción del polipéptido.

La secuencia codificante de proteína que incluye un péptido agonista de GCC descrito en este documento también se puede fusionar a un ácido nucleico que codifica una etiqueta de afinidad de polipéptido, por ejemplo, glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, proteína A, etiqueta FLAG, hexa-histidina, etiqueta myc o la etiqueta HA de influenza, para facilitar la purificación. La etiqueta de afinidad o la fusión informadora se une al marco de lectura del polipéptido de interés al marco de lectura del gen que codifica la etiqueta de afinidad de manera que se genera una fusión traduccional. La expresión del gen de fusión da como resultado la traducción de un único polipéptido que incluye tanto el polipéptido de interés como la etiqueta de afinidad. En algunos casos en los que se utilizan etiquetas de afinidad, la secuencia de ADN que codifica un sitio de reconocimiento de proteasa se fusionará entre los marcos de lectura para la etiqueta de afinidad y el polipéptido de interés.

Los construcciones y procedimientos genéticos apropiados para la producción de formas inmaduras y maduras de los péptidos agonistas de GCC y las variantes descritas en este documento en sistemas de expresión de proteínas distintos de las bacterias, y bien conocidos para los expertos en el arte, también se pueden usar para la producción de polipéptidos en un sistema biológico.

Los péptidos descritos en este documento se pueden modificar mediante la unión de una segunda molécula que confiere una propiedad deseada sobre el péptido, tal como una semivida aumentada en el cuerpo, por ejemplo, pegilación. Tales modificaciones también caen dentro del alcance del término "variante" como se usa en este documento.

Tabla I de la invención y divulgación. Péptidos GCRA (SP-304 y Derivados)

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
SP-304	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	1
SP-326	C3:C11, C6:C14	Asp ¹ -Glu ² -Cys ³ -Glu ⁴ -Leu ⁵ -Cys ⁶ -Val ⁷ -Asn ⁸ -Val ⁹ -Ala ¹⁰ -Cys ¹¹ -Thr ¹² -Gly ¹³ -Cys ¹⁴ -Leu ¹⁵	2
SP-327	C2:C10, C5:C13	Asp ¹ -Glu ² -Cys ³ -Glu ⁴ -Leu ⁵ -Cys ⁶ -Val ⁷ -Asn ⁸ -Val ⁹ -Ala ¹⁰ -Cys ¹¹ -Thr ¹² -Gly ¹³ -Cys ¹⁴	3

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
SP-328	C2:C10, C5:C13	Glu ¹ -Cys ² -Glu ³ -Leu ⁴ -Cys ⁵ -Val ⁶ -Asn ⁷ -Val ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Leu ¹⁴	4
SP-329	C2:C10, C5:C13	Glu ¹ -Cys ² -Glu ³ -Leu ⁴ -Cys ⁵ -Val ⁶ -Asn ⁷ -Val ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³	5
SP-330	C1:C9, C4:C12	Cys ¹ -Glu ² -Leu ³ -Cys ⁴ -Val ⁵ -Asn ⁶ -Val ⁷ -Ala ⁸ -Cys ⁹ -Thr ¹⁰ -Gly ¹¹ -Cys ¹² -Leu ¹³	6
SP-331	C1:C9, C4:C12	Cys ¹ -Glu ² -Leu ³ -Cys ⁴ -Val ⁵ -Asn ⁶ -Val ⁷ -Ala ⁸ -Cys ⁹ -Thr ¹⁰ -Gly ¹¹ -Cys ¹²	7
SP332	C4:C12,C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	8
SP-333	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ - Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² - Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	9
SP-334	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	10
SP-335	C4:C12,C7:C 15	dAsn ¹ -dAsp ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	11
SP-336	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	12
SP-337	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -dLeu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	13
SP-338	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	14
SP-342	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	15
SP-343	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	16
SP-344	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	17
SP-347	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	18
SP-348	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	19
SP-350	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Var ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	20
SP-352	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	21
SP-358	C4:C12,C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -dAsp ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ - PEG3	22
SP-359	C4:C12,C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	23
SP-360	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	24

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
SP-361	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	25
SP-362	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	26
SP-368	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dNal ¹⁶	27
SP-369	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -AIB ⁸ -Asn ⁹ -AIB ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	28
SP-370	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Asp[Lactam] ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Orn ¹⁵ -dLeu ¹⁶	29
SP-371	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	30
SP-372	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	31
N1	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	32
N2	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	33
N3	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ PEG3	34
N4	C4:C12,C7:C 15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	35
N5	C4:C12,C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶	36
N6	C4:C12,C7:C 15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu ¹⁶ -PEG3	37
N7	C4:C12,C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	38
N8	C4:C12,C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶)-PEG3	39
N9	C4:C12,C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	40
N10	C4:C12,C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶ -PEG3	41
N11	C4:C12,C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁶ -dSer ¹⁶ -PEG3	42
N12	C4:C12,C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp-Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹² -Cys ¹³ -dSer ¹⁶	43
N13	C4:C12,C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dSer ¹⁶ -PEG3	44

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
Fórmula I	C4:C12,C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa ¹⁶	45
Fórmula II	C4:C12,C7:C15	Xaa _{n1} -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa _{n2} ¹⁶	46
Fórmula III	4:12,7:15	Xaa _{n1} -Maa ⁴ -Glu ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Maa ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Maa ¹⁵ -Xaa _{n2}	47
Fórmula IV	4:12,7:15	Xaa _{n1} -Maa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Maa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Maa ¹⁵ -Xaa _{n2}	48
Fórmula V	C4:C12,C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Asn ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa ¹⁶	49
Fórmula VI	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -X3 ⁸ -Asn ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	50
Fórmula VII	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -dGlu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Asn ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	51
Fórmula VII	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Asn ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	52
Fórmula VIII	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Tyr ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	53
Fórmula IX	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -dGlu ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Tyr ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	54

Tabla II de la divulgación. Linaclotida y Derivados

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
SP-339 (linaclotida)	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴	55
SP-340	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹⁰ -Gly ¹² -Cys ¹³	56
SP-349	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹¹ -Tyr ¹⁴ -PEG3	57
SP-353	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	58
SP-354	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	59

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
SP-355	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -dTyr ¹⁴	60
SP-357	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴	61
SP-374	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	62
SP-375	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	63
SP-376	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	64
SP-377	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	65
SP-378	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	66
SP-379	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	67
SP-380	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	68
SP-381	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	69
SP-382	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹³ -Tyr ¹⁶	70
SP-383	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	71
SP-384	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴ -PEG3	72
N14	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -PEG3	73
N15	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³	74

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
N16	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -PEG3	75
N17	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3- Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	76
N18	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3- Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	77
N19	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	78
N20	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3- Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	79
N21	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3- Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	80
N22	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	81
N23	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3- Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	82
N24	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3- Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	83
N25	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	84
N26	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Ser ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴	85
N27	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Phe ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴	86
N28	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Ser ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³	87
N29	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Phe ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³	88
N30	1:6, 2:10, 5:13	Pen ¹ -Pen ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Pen ⁵ -Pen ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Pen ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Pen ¹³ -Tyr ¹⁴	89

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
N31	1:6, 2:10, 5:13	Pen ¹ -Pen ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Pen ⁵ -Pen ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Pen ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Pen ¹³	90
Fórmula X	C9:C14, C10:C18, C13:21	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Xaa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Asn ⁷ -Tyr ⁸ -Cys ⁹ -Cys ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Tyr ¹² -Cys ¹³ -Cys ¹⁴ -Xaa ¹⁵ -Xaa ¹⁶ -Xaa ¹⁷ -Cys ¹⁸ -Xaa ¹⁹ -Xaa ²⁰ -Cys ²¹ -Xaa ²²	91
Fórmula XI	C9:C14, C10:C18, C13:21	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Xaa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Asn ⁷ -Phe ⁸ -Cys ⁹ -Cys ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Phe ¹² -Cys ¹³ -Cys ¹⁴ -Xaa ¹⁵ -Xaa ¹⁶ -Xaa ¹⁷ -Cys ¹⁸ -Xaa ¹⁹ -Xaa ²⁰ -Cys ²¹ -Xaa ²²	92
Fórmula XII	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa ¹⁶	93
Fórmula XIII	3:8, 4:12, C:15	Asn ¹ -Phe ² -Pen ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Pen ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa ¹⁶	94
Fórmula XIV	3:8, 4:12, 7:15	Asn ¹ -Phe ² -Maa ³ -Maa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Maa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Maa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Maa ¹⁵ -Xaa ¹⁶	95
Fórmula XV	1:6, 2:10, 5:13	Maa ¹ -Maa ² -Glu ³ -Xaa ⁴ -Maa ⁵ -Maa ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Maa ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Maa ¹³ -Tyr ¹⁴	96
Fórmula XVI	1:6, 2:10, 5:13	Maa ¹ -Maa ² -Glu ³ -Xaa ⁴ -Maa ⁵ -Maa ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Maa ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Maa ¹³	97
Fórmula XVII	1:6, 2:10, 5:13	Xaa _{n3} ¹ -Maa ¹ -Maa ² -Xaa ³ -Xaa ⁴ -Maa ⁵ -Maa ⁶ -Xaa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Maa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Xaa ¹² -Maa ¹³ -Xaa _{n2}	98

Tabla III. Péptidos GCRA

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
SP-363	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dSer ¹⁶ AMIDA ¹⁶	99
SP-364	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asr ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dSer ¹⁶	100
SP-365	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dSer ¹⁶ AMIDA ¹⁶	101
SP-366	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	102

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
SP-367	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr-AMIDA ¹⁶	103
SP-373	C4:C12, C7:C15	Pyglu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu-AMIDA ¹⁶	104
SP-304 di PEG	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	105
SP-304 NPEG	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	106
SP-304 CPEG	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ¹⁰ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶ -PEG3	107

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

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
Fórmula XVIII	C4:C12, C7:C15	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Maa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Maa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Maa ¹⁵ -Xaa ¹⁶	108
Uroguanilina	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	109
N32	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	110
N33	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	111
N34	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	112
N35	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	113
N36	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	114
N37	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	115
N38	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	116
N39	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	117
N40	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	118

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
N41	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	119
N42	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	120
N43	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	121
N44	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	122
N45	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	123
N46	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	124
N47	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	125
N48	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	126
N49	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	127
N50	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	128
N51	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	129
N52	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	130
N53	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	131
N54	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	132
N55	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	133
N56	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	134
N57	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	135
N58	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	136
N59	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	137
N60	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	138

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
N61	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	139
N62	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	140
N63	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	141
N65	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	142
N66	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	143
N67	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	144
N68	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	145
N69	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	146
N70	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	147
N71	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	148
N72	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	149
N73	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	150
N74	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	151
N75	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	152
N76	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	153
N77	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	154
N78	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	155
N79	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	156
N80	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	157
N81	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	158

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
N82	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	159
N83	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	160
N84	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	161
N85	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	162
N86	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	163
N87	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	164
N88	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	165
N89	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	166
N90	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	167
N91	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	168
N92	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	169
N93	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	170
N94	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	171
N95	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	172
N96	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	173

Tabla V de la divulgación. Guanilina y Análogos

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
Fórmula XIX	4:12,7:15	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Maa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Maa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Maa ¹⁵	174
Guanilina	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Phe ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	175
N97	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	176

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
N98	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	177
N99	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	178
N100	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	179
N101	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	180
N102	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	181
N103	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	182
N104	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	183
N105	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	184
N106	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	185
N107	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	186
N108	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	187
N109	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	188
N110	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	189
N111	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	190
N112	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	191
N113	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	192
N114	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	193
N115	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	194
N116	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	195
N117	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	196

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
N118	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	197
N119	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	198
N120	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	199
N121	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	200
N122	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	201
N123	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	202
N124	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	203
N125	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	204
N126	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	205
N127	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	206
N128	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	207

Tabla VI de la divulgación. Linfoganilina y Análogos

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
Fórmula XX	4:12,7:15	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Maa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Maa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Xaa _{n1} ¹⁵	208
Linfoganilina	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	209
N129	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	210
N130	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	211
N131	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	212
N132	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	213
N133	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	214

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
N134	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵ -	215
N135	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹³	216
N136	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	217
N137	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	218
N138	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	219
N139	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	220
N140	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	221
N141	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	222
N142	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	223
N143	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	224
N144	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	225
N145	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	226
N146	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	227
N147	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	228
N148	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	229
N149	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	230
N150	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser	231
N151	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	232
N152	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cyr ¹⁵ -Ser ¹⁶	233
N153	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	234

ES 2 664 873 T3

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
N154	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	235
N155	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	236
N156	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	237
N157	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	238
N158	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	239
N159	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	240
N160	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁵ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	241

Tabla VII de la divulgación. Péptido ST y análogos

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

1.2 Métodos de uso

La divulgación proporciona procedimientos para tratar o prevenir trastornos gastrointestinales y aumentar la motilidad gastrointestinal en un sujeto que lo necesite administrando una cantidad eficaz de un agonista de GCC o una formulación de los mismos al sujeto. Los ejemplos no limitantes de trastornos gastrointestinales que se pueden tratar o prevenir de acuerdo con los procedimientos de la invención incluyen el síndrome del intestino irritable (IBS), la dispepsia no ulcerosa, las úlceras relacionadas con la infección por *H. pylori*, la pseudoobstrucción intestinal crónica, la dispepsia funcional, pseudoobstrucción del colon, reflujo duodenogástrico, enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), íleo (por ejemplo, íleo postoperatorio), gastroparesia, acidez gástrica (alta acidez en el tracto GI), estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado con el uso de medicamentos tales como opioides, fármacos para la osteoartritis, o fármacos para la osteoporosis); estreñimiento postquirúrgico, estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

En una realización, la divulgación proporciona procedimientos para tratar o prevenir el trastorno de la motilidad gastrointestinal, el síndrome del intestino irritable, un trastorno gastrointestinal funcional, enfermedad por reflujo gastroesofágico, reflujo duodenogástrico, acidez gástrica funcional, dispepsia, dispepsia funcional, dispepsia no ulcerosa, gastroparesia, pseudoobstrucción intestinal crónica, pseudoobstrucción colónica, obesidad, insuficiencia cardíaca congestiva o hiperplasia prostática benigna.

En una realización, la divulgación proporciona procedimientos para tratar o prevenir el estreñimiento y/o aumentar la motilidad gastrointestinal en un sujeto que lo necesita administrando una cantidad eficaz de un agonista de GCC o una formulación de la misma al sujeto. Los criterios clínicamente aceptados que definen el estreñimiento varían desde la frecuencia de los movimientos intestinales, la consistencia de las heces y la facilidad de evacuación intestinal. Una definición común de estreñimiento es menos de tres deposiciones por semana. Otras definiciones incluyen deposiciones anormalmente duras o defecación que requiere un esfuerzo excesivo (Schiller 2001 Aliment Pharmacol Ther 15:749-763). El estreñimiento puede ser idiopático (estreñimiento funcional o estreñimiento de tránsito lento) o secundario a otras causas incluyendo 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 autonómica, enfermedad de Chagas, enfermedad de Hirschsprung y fibrosis quística. El estreñimiento también puede ser el resultado de una cirugía o debido al uso de fármacos tales como analgésicos (como opioides), antihipertensivos, anticonvulsivos, antidepresivos, antiespasmódicos y antipsicóticos.

En diversas realizaciones, el estreñimiento está asociado con el uso de un agente terapéutico; el estreñimiento se asocia con un trastorno neuropático; el estreñimiento es estreñimiento posquirúrgico; el estreñimiento se asocia con un trastorno gastrointestinal; el estreñimiento es idiopático (estreñimiento funcional o estreñimiento de tránsito lento); el estreñimiento está asociado con un trastorno neuropático, metabólico o endocrino (por ejemplo, diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipocalcemia, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal, neurofibromatosis, neuropatía autonómica, enfermedad de Chagas, enfermedad de Hirschsprung o fibrosis quística). El estreñimiento también puede ser el resultado de una cirugía o debido al uso de fármacos tales como analgésicos (por ejemplo, opioides), antihipertensivos, anticonvulsivos, antidepresivos, antiespasmódicos y antipsicóticos.

En una realización, la divulgación proporciona procedimientos para tratar o prevenir el estreñimiento idiopático crónico y el aumento de la motilidad gastrointestinal en un sujeto que lo necesite administrando una cantidad eficaz de un agonista de GCC o una formulación de los mismos al sujeto. El término "tratar" como se usa en este documento se refiere a una reducción, una mejora parcial, una mejora o una mitigación de al menos un síntoma clínico asociado con los trastornos gastrointestinales que se tratan. El término "prevenir" se refiere a una inhibición o retraso en el inicio o la progresión de al menos un síntoma clínico asociado con los trastornos gastrointestinales que se deben prevenir. El término "cantidad eficaz" como se usa en este documento se refiere a una cantidad que proporciona alguna mejora o beneficio al sujeto. En ciertas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad que proporciona algún alivio, mitigación y/o disminución en al menos un síntoma clínico del trastorno gastrointestinal que se va a tratar. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es la cantidad que proporciona cierta inhibición o retraso en la aparición o progresión de al menos un síntoma clínico asociado con el trastorno gastrointestinal que se debe prevenir. Los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre que se proporcione algún beneficio al sujeto. El término "sujeto" se refiere preferiblemente a un sujeto humano, pero también se puede referir a un primate no humano u otro mamífero preferiblemente seleccionado entre un ratón, una rata, un perro, un gato, una vaca, un caballo o un cerdo.

La divulgación también proporciona procedimientos para tratar el cáncer gastrointestinal en un sujeto que lo necesita administrando una cantidad eficaz de un agonista de GCC o una formulación de los mismos al sujeto. Los ejemplos no limitantes de cánceres gastrointestinales que se pueden tratar según los procedimientos de la invención incluyen cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer intestinal, cáncer de ano, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar y cáncer de colon.

La divulgación también proporciona procedimientos para tratar trastornos del metabolismo lipídico, trastornos biliares, trastornos inflamatorios, trastornos pulmonares, cáncer, trastornos cardíacos incluyendo trastornos cardiovasculares, trastornos oculares, trastornos orales, trastornos sanguíneos, trastornos hepáticos, trastornos de la piel, trastornos de la próstata, enfermedades endocrinas trastornos y obesidad.

5 Los trastornos del metabolismo de lípidos incluyen, pero no limitando a, dislipidemia, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, sitosterolemia, hipercolesterolemia familiar, xantoma, hiperlipidemia combinada, deficiencia de lecitina colesterol aciltransferasa, enfermedad de Tangier, abetalipoproteinemia, disfunción eréctil, enfermedad de hígado graso y hepatitis.

10 Los trastornos biliares incluyen trastornos de la vesícula biliar tales como, por ejemplo, cálculos biliares, colangitis por cáncer de vejiga biliar o colangitis esclerosante primaria; o trastornos del conducto biliar tales como, por ejemplo, colecistitis, cáncer de las vías biliares o fascioliasis.

15 Los trastornos inflamatorios incluyen inflamación de tejidos y órganos tal como inflamación de riñón (por ejemplo, nefritis), inflamación del sistema gastrointestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enterocolitis necrosante (NEC); inflamación pancreática (por ejemplo, pancreatitis), insuficiencia pancreática, inflamación pulmonar (por ejemplo, bronquitis o asma) o inflamación de la piel (por ejemplo, psoriasis, eccema).

Los trastornos pulmonares incluyen, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y fibrosis.

20 El cáncer incluye carcinogénesis de tejidos y órganos que incluye metástasis tales como, por ejemplo, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer colorrectal de cáncer de páncreas, cáncer intestinal, cáncer de ano, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar o cáncer de colon; cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma), cáncer oral, cáncer de vías urinarias (por ejemplo, cáncer de vejiga o cáncer de riñón), cáncer de sangre (por ejemplo, mieloma o leucemia) o cáncer de próstata.

25 Los trastornos cardíacos incluyen, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión de la tráquea cardíaca, colesterol alto o triglicéridos elevados. Los trastornos cardiovasculares incluyen, por ejemplo, aneurisma, angina, aterosclerosis, accidente cerebrovascular (apoplejía), enfermedad cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de la arteria coronaria, infarto de miocardio (ataque cardíaco) o enfermedad vascular periférica.

30 Los trastornos hepáticos incluyen, por ejemplo, cirrosis y fibrosis. Además, el agonista de GC-C también puede ser útil para facilitar la regeneración hepática en pacientes con trasplante de hígado. Los trastornos oculares incluyen, por ejemplo, aumento de la presión intraocular, glaucoma, ojos secos, degeneración de la retina, trastornos de las glándulas lagrimales o inflamación de los ojos. Los trastornos de la piel incluyen, por ejemplo, xerosis. Los trastornos orales incluyen, por ejemplo, boca seca (xerostomía), síndrome de Sjögren, enfermedades de las encías (por ejemplo, enfermedad periodontal) o bloqueo o mal funcionamiento del conducto de la glándula salival. Los trastornos de la próstata incluyen, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna (BPH). Los trastornos endocrinos incluyen, por ejemplo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, hipotiroidismo y fibrosis quística.

35 1.2.1 Dosis terapéuticamente eficaces

Los trastornos se tratan, previenen o alivian administrando a un sujeto, por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano que lo necesita, una dosis terapéuticamente eficaz de un péptido agonista de GCC. La presente invención se basa en parte en los resultados inesperados de ensayos clínicos en seres humanos que demostraron que las formulaciones descritas en este documento son terapéuticamente eficaces a dosis mucho más bajas que las predichas en base a estudios en animales. De acuerdo con un aspecto de la divulgación, la dosis terapéuticamente eficaz está entre 0.01 miligramos (mg) y 10 mg por dosis unitaria. El término "dosis unitaria" se refiere a una única entidad de administración de fármacos, por ejemplo, una formulación de comprimido, cápsula, solución, inhalación, de liberación controlada o liberación prolongada (por ejemplo, tecnología MMX® de Cosmo Pharmaceuticals). En una realización, la dosis eficaz está entre 0.01 mg y 9 mg. En otra realización, la dosis eficaz está entre 0.01 mg y 5 mg. En otra realización, la dosis eficaz está entre 0.01 mg y 3 mg. En otra realización, la dosis eficaz está entre 0.10 mg y 5 mg. En otra realización, la dosis eficaz está entre 0.10 mg y 3 mg. En una realización, la dosis unitaria es de 0.01 mg, 0.05 mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.5 mg, 1.0 mg, 1.5 mg, 2.0 mg, 2.5 mg, 3.0 mg, 5 mg o 10 mg. En una realización, la dosis unitaria es 0.3 mg, 1.0 mg, 3.0 mg, 9.0 mg o 9.5 mg.

50 Los péptidos agonistas de GCC pueden estar en una composición farmacéutica en forma de dosis unitaria, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La cantidad de péptido presente debería ser suficiente para tener un efecto terapéutico positivo cuando se administra a un paciente. Lo que constituye un "efecto terapéutico positivo" dependerá de la afección particular que se trate e incluirá cualquier mejora significativa en una condición fácilmente reconocible por un experto en el arte.

55 Los agonistas de GCC para uso en los procedimientos descritos anteriormente se administran preferiblemente por vía oral. Las formas de dosificación incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos y cápsulas.

La dosis diaria total se puede administrar al paciente en una sola dosis o en múltiples subdosis. Por lo general, las subdosis se pueden administrar de dos a seis veces por día, preferiblemente de dos a cuatro veces por día, e incluso más preferiblemente de dos a tres veces por día. Preferiblemente, se administra una única dosis diaria.

5 Los agonistas de GCC se pueden administrar como ya sea el único agente activo o en combinación con uno o más agentes activos adicionales. En todos los casos, los agentes activos adicionales se deben administrar a una dosis que sea terapéuticamente eficaz usando la técnica existente como guía. Los agonistas de GCC se pueden administrar en una única composición o secuencialmente con uno o más agentes activos adicionales. En una realización, el agonista de GCC se administra en combinación con uno o más inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de cGMP tal como suldinac sulfona, zaprinast, motapizona, vardenafil o sildenafil. En otra realización, el agonista de GCC se administra en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. En otra realización, el agonista de GCC se administra en combinación con uno o más fármacos antiinflamatorios tales como esteroides o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDS), tales como aspirina.

15 La terapia de combinación se puede lograr administrando dos o más agentes, por ejemplo, un péptido agonista de GCC descrito en este documento y otro compuesto, cada uno de los cuales se formula y administra por separado, o administrando dos o más agentes en una única formulación. Otras combinaciones también están abarcadas por la terapia de combinación. Por ejemplo, dos agentes se pueden formular juntos y administrarse junto con una formulación separada que contiene un tercer agente. Si bien los dos o más agentes en la terapia de combinación se pueden administrar simultáneamente, no es necesario que lo sean. 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) por minutos, horas, días o semanas. De este modo, los dos o más agentes se pueden administrar en cuestión de minutos el uno del otro o dentro de 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 o 24 horas entre sí o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 días de diferencia o dentro de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas de diferencia. En algunos casos, incluso son posibles intervalos más largos. Si bien en muchos casos es deseable que los dos o más agentes usados en una terapia de combinación estén presentes dentro del cuerpo del paciente al mismo tiempo, esto no tiene por qué ser así.

Los péptidos agonistas de GCC descritos en este documento se pueden combinar con inhibidores de fosfodiesterasa, por ejemplo, sulindae sulfona, Zaprinast, sildenafil, vardenafil o tadalafil para mejorar adicionalmente los niveles de cGMP en los tejidos u órganos diana.

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

1.2.2 Agentes de ejemplo para la terapia combinada

35 Las formulaciones agonistas de GCC de la divulgación se pueden administrar solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno gastrointestinal. En algunas realizaciones, la formulación del agonista de GCC comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales. En otras realizaciones, el agonista de GCC se formula por separado de uno o más agentes terapéuticos adicionales. De acuerdo con esta realización, el agonista de GCC se administra de forma simultánea, secuencial o en un momento diferente del uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una realización, la formulación de agonista de GCC se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de fosfodiesterasa, nucleótidos cíclicos (tales como cGMP y cAMP), un laxante (tal como SENNA o METAMUCIL), un ablandador de heces, una terapia alfa factor de necrosis antitumoral para la IBD (tales como REMICADE, ENBREL o HUMIRA) y fármacos antiinflamatorios (tales como inhibidores de la COX-2, sulfasalazina, derivados de 5-ASA y NSAIDS). En ciertas realizaciones, la formulación del agonista de GCC se administra en combinación con una dosis eficaz de un inhibidor de fosfodiesterasa específica de cGMP (cGMP-PDE), ya sea concurrente o secuencialmente con dicho agonista de GCC. Los inhibidores de cGMP-PDE incluyen, por ejemplo, suldinac sulfona, zaprinast, motapizona, vardenafil y sildenafil. En otra realización, la formulación del agonista de GCC se administra en combinación con inhibidores de transportadores de nucleótidos cíclicos. Se dan ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden administrar en combinación con las formulaciones agonistas de GCC de la NSAIDS en las siguientes secciones.

1.2.2.1 Agentes para tratar el cáncer gastrointestinal

55 Las formulaciones agonistas de GCC descritas en este documento se pueden usar en combinación con uno o más agentes antitumorales incluyendo, pero no limitando a, agentes alquilantes, epipodofilotoxinas, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides de vinca, antibióticos de antraciclina, agentes de mostaza nitrogenada y similares. Los agentes antitumorales particulares incluyen tamoxifeno, taxol, etopósido y 5-fluorouracilo. En una realización, las formulaciones agonistas de GCC se usan en combinación con un agente antiviral o un anticuerpo monoclonal.

Los ejemplos no limitantes de agentes antitumorales que se pueden usar en combinación con las formulaciones agonistas de GCC de la divulgación para el tratamiento del cáncer de colon incluyen agentes antiproliferativos, agentes para la modificación o reparación del ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, reguladores de la transcripción del ADN/ARN, inhibidores de procesamiento de ARN, agentes que afectan la expresión, síntesis y estabilidad de proteínas, agentes que afectan la localización de proteínas o su capacidad para ejercer su acción fisiológica, agentes que interfieren con interacciones proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, agentes que actúan por ARN interferencia, moléculas de unión a receptores de cualquier naturaleza química (incluyendo moléculas pequeñas y anticuerpos), toxinas dirigidas, activadores de enzimas, inhibidores de enzimas, reguladores de genes, inhibidores de HSP-90, moléculas que interfieren con microtúbulos u otros componentes del citoesqueleto o adhesión celular y motilidad, agentes para fototerapia y complementos de terapia.

Los agentes antiproliferativos representativos incluyen N-acetil-D-esfingosina (ceramida C₂), apigenina, cloruro de berberina, sal disódica del ácido diclorometilendifosfónico, loe-emodina, emodina, HA 14-1, N-hexanoil-D-esfingosina (ceramida C₆), 7b-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, hiperforina, partenolida, y rapamicina.

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

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

Los reguladores de la transcripción de ADN/ARN representativos incluyen actinomicina D, clorhidrato de daunorrubicina, 5,6-diclorobencimidazol 1-b-D-ribofuranosida, clorhidrato de doxorrubicina, homoharringtonina y clorhidrato de idarrubicina.

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

Los reguladores génicos representativos incluyen 5-aza-2'-desoxicitidina, 5-azacitidina, colecalciferol (vitamina D₃), ciglitazona, acetato de ciproterona, 15-desoxi-D¹²,14-prostaglandina J₂, epitestosterona, flutamida, sal de amonio del ácido glicirricico (glicirricina), 4-hidroxitamoxifeno, mifepristona, clorhidrato de procainamida, clorhidrato de raloxifeno, todo trans-retinal (aldehído de vitamina A), ácido retinoico (ácido de vitamina A), ácido 9-cis-retinoico, ácido 13-cis-retinoico, ácido retinoico p-hidroxianilida, retinol (vitamina A), tamoxifeno, sal de citrato de tamoxifeno, ácido tetradeciltoacético y troglitazona.

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

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

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

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

Los agentes también pueden ser agentes anti-VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), como tales son conocidos en la técnica. Varios anticuerpos y pequeñas moléculas se encuentran actualmente en ensayos clínicos o se ha aprobado esa función inhibiendo el VEGF, tal como Avastin (Bevacizumab), SU5416, SU11248 y BAY 43-9006. Los agentes también se pueden dirigir contra los receptores del factor de crecimiento como los de la familia EGF/Erb-B, tal como el Receptor EGF (Iressa o Gefitinib, y Tarceva o Erlotinib), el receptor Erb-B2, (Herceptin o Trastuzumab), otros receptores (tales como Rituximab o Rituxan/MabThera), tirosina quinasas, tirosina quinasas no receptoras, serina/treonina quinasas celulares (incluidas MAP quinasas), y diversas otras proteínas cuya desregulación contribuye a la oncogénesis (tal como la familia Ras/pequeña y las proteínas G heterotriméricas/grandes). Varios anticuerpos y moléculas pequeñas que se dirigen a esas moléculas se encuentran actualmente en diversas etapas de desarrollo (incluidos los aprobados para el tratamiento o en ensayos clínicos).

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

1.2.2.2 Agentes que tratan la enfermedad de Crohn

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

1.2.2.3 Agentes que tratan la colitis ulcerosa

En una realización, se administra una formulación agonista de GCC de la divulgación como parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la colitis ulcerosa. Los agentes que se usan para tratar la colitis ulcerosa se superponen con los usados para tratar la enfermedad de Crohn. Los ejemplos no limitantes de uno o más agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar en combinación con una formulación agonista de GCC de la divulgación incluyen aminosalicilatos (fármacos que contienen ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)) tales como sulfasalazina, olsalazina, mesalamina, y balsalazide. Otros agentes terapéuticos que se pueden usar incluyen corticosteroides, tales como prednisona e hidrocortisona, inmunomoduladores, tales como azatioprina, 6-mercaptopurina (6-MP), citoquinas, interleucinas y linfoquinas, y agentes anti-TNF-alfa, incluidas las tiazolidinedionas o glitazonas tales como rosiglitazona y pioglitazona. En una realización, el uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye tanto ciclosporina A como 6-MP o azatioprina para el tratamiento de la colitis ulcerosa grave activa.

1.2.2.4 Agentes que tratan el estreñimiento/síndrome de intestino irritable

En una realización, una formulación de agonista de GCC de la divulgación se administra como parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento del estreñimiento, tal como el asociado con el síndrome de intestino irritable. Los ejemplos no limitantes del uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen laxantes tales como SENNA, MIRALAX, LACTULOSA, PEG o policarbofilo de calcio), suavizantes de heces (tales como aceite mineral o COLACE), agentes de carga (tales como METAMUCIL o salvado), agentes tales como ZELNORM (también llamado tegaserod) y medicamentos anticolinérgicos tales como BENTYL y LEVSIN.

1.2.2.5 Agentes para el tratamiento del íleo postoperatorio

En una realización, una formulación de agonista de GCC de la divulgación se administra como parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de íleo postoperatorio. Los ejemplos no limitantes del uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen ENTEREG (alvimopan, anteriormente llamado ado lor/ADL 8-2698), conivaptan y agentes relacionados se describen en el documento US 6,645,959.

1.2.2.6 Agentes contra la obesidad

En una realización, una formulación agonista de GCC de la divulgación se administra como parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la obesidad. Los ejemplos no limitantes del uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen inhibidores de 11 β HSD-I (11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1), tales como BVT 3498, BVT 2733, 3-(1-adamantil)-4-etil-5-(etilio)-4H-1,2,4-triazol, 3-(1-adamantil)-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-metil-4H-1,2,4-triazol, 3-adamantil-4,5,6,7,8,9,10,11,12,3a-decahidro-1,2,4-triazolo[4,3-a][11]annuleno, y aquellos compuestos descritos en los documentos WO01/90091, WO01/90090, WO01/90092 y WO02/072084; antagonistas 5HT tales como aquellos en los documentos WO03/037871, WO03/037887, y similares; moduladores de 5HT α tales como carbidopa, benserazida y los descritos en los documentos US6207699, WO03/031439, y similares; agonistas de 5HT $2c$ (receptor de serotonina 2c), tales como BVT933, DPCA37215, IK264, PNU 22394, WAY161503, R-1065, SB 243213 (Glaxo Smith Kline) y YM 348 y los descritos en los documentos US3914250, WO00/77010, WO02/36596, WO02/48124, WO02/10169, WO01/66548, WO02/44152, WO02/51844, WO02/40456, y WO02/40457; moduladores del receptor 5HT 6 , tales como aquellos en los documentos WO03/030901, WO03/035061, WO03/039547, y similares; acil-estrógenos, tales como oleoil-estrona, descritos en del Mar-Grasa, M. et al, Obesity Research, 9:202-9 (2001) y la Solicitud de Patente

Japonesa No. JP 2000256190; compuestos bicíclicos anoréxicos tales como 1426 (Aventis) y 1954 (Aventis), y los compuestos descritos en los documentos WO00/18749, WO01/32638, WO01/62746, WO01/62747, y WO03/015769; CB 1 (receptor de cannabinoides 1) antagonistas/agonistas inversos tales como rimonabant (Acomplia; Sanofi), SR-147778 (Sanofi), SR-141716 (Sanofi), BAY 65-2520 (Bayer), y SLV 319 (Solvay), y aquellos descritos en las

5 Publicaciones de Patentes US4973587, US5013837, US5081122, US5112820, US5292736, US5532237, US5624941, US6028084, US6509367, US6509367, WO96/33159, WO97/29079, WO98/31227, WO98/33765, WO98/37061, WO98/41519, WO98/43635, WO98/43636, WO99/02499, WO00/10967, WO00/10968, WO01/09120, WO01/58869, WO01/64632, WO01/64633, WO01/64634, WO01/70700, WO01/96330, WO02/076949, WO03/006007, WO03/007887, WO03/020217, WO03/026647, WO03/026648, WO03/027069, WO03/027076,

10 WO03/027114, WO03/037332, WO03/040107, WO03/086940, WO03/084943 y EP658546; agonistas de CCK-A (colecistoquina-A), tales como AR-R 15849, GI 181771 (GSK), JMV-180, A- 71378, A-71623 y SR146131 (Sanofi), y aquellos descritos en el documento US5739106; CNTF (factores neurotróficos ciliares), tales como GI- 181771 (Glaxo-SmithKline), SRI 46131 (Sanofi Synthelabo), butabindida, PD 170,292, y PD 149164 (Pfizer); derivados de CNTF, tales como Axokine® (Regeneron), y aquellos descritos en los documentos WO94/09134, WO98/22128, y

15 WO99/43813; inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DP-IV), tales como isoleucina tiazolidida, valina pirrolidida, NVP-DPP728, LAF237, P93/01, P 3298, TSL 225 (ácido triptofil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3- carboxílico; descrito por Yamada et al, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 8 (1998) 1537-1540), TMC-2A/2B/2C, inhibidores de CD26, FE 999011, P9310/K364, VIP 0177, SDZ 274-444, 2- cianopirrolididas y 4-cianopirrolididas como se describe por Ashworth et al, Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 6, No. 22, pp 1163-1166 y 2745-2748 (1996) y los compuestos

20 descritos en las Publicaciones de Patentes. WO99/38501, WO99/46272, WO99/67279 (Probiodrug), WO99/67278 (Probiodrug), WO99/61431 (Probiodrug), WO02/083128, WO02/062764, WO03/000180, WO03/000181, WO03/000250, WO03/002530, WO03/002531, WO03/002553, WO03/002593, WO03/004498, WO03/004496, WO03/017936, WO03/024942, WO03/024965, WO03/033524, WO03/037327 y EP1258476; agonistas/antagonistas del receptor secretagogo de la hormona de crecimiento, tales como NN703, hexarelina, MK- 0677 (Merck), SM-130686, CP-424391 (Pfizer), LY 444,711 (Eli Lilly), L-692,429 y L- 163,255, y tales como aquellos descritos en

25 USSN 09/662448, Solicitud Provicional de los Estados Unidos 60/203335, US6358951, US2002049196, US2002/022637, WO01/56592 y WO02/32888; antagonista/agonistas inversos de H3 (histamina H3), tales como tioperamida, 3-(1H-imidazol-4-il)propil N-(4-pentenil)carbamato, clobenpropit, yodofenpropit, imoproxifan, GT2394 (Gliatech), y A331440, O-[3-(1H-imidazol-4-il)propanol]carbamatos (Kiec-Kononowicz, K. et al., Pharmazie, 55:349-55 (2000)), antagonistas del receptor H3 de histamina que contiene piperidina (Lazewska, D. et al., Pharmazie, 56:927-32 (2001), derivados de benzofenona y compuestos relacionados (Sasse, A. et al., Arch. Pharm.(Weinheim) 334:45-52 (2001)), fenilcarbamatos N sustituidos (Reidemeister, S. et al., Pharmazie, 55:83-6 (2000)), y derivados de proxifan (Sasse, A. et al., J. Med. Chem. 43:3335-43 (2000)) y moduladores del receptor H3 de histamina tales como aquellos descritos en WO02/15905, WO03/024928 y WO03/024929; derivados de leptina, tales como aquellos

35 descritos en US5552524, US5552523, US5552522, US5521283, WO96/23513, WO96/23514, WO96/23515, WO96/23516, WO96/23517, WO96/23518, WO96/23519, y WO96/23520; leptina, incluyendo leptina recombinante humana (PEG-OB, Hoffman La Roche) y leptina metionil recombinante humana (Amgen); inhibidores de lipasa, tales como tetrahidrolipstatina (orlistat/Xenical®), Triton WRI 339, RHC80267, lipstatina, teasaponina, dietilumbelliferil fosfato, FL-386, WAY-121898, Bay-N-3176, valilactona, esteracina, ebelactona A, ebelactona B, y RHC 80267, y

40 aquellos descritos en las Publicaciones de Patentes WOO 1/77094, US4598089, US4452813, USUS5512565, US5391571, US5602151, US4405644, US4189438, y US4242453; moduladores del metabolismo lipídico tales como ácido maslínico, eritrodilol, ácido ursólico uvaol, ácido betulínico, betulina, y similares y compuestos descritos en el documento WO03/011267; agonistas de Mc4r (receptor de la melanocortina 4), tales como CHIR86036 (Chiron), ME-10142, ME-10145, y HS-131 (Melacure), y aquellos descritos en las Publicaciones PCT Nos. WO99/64002,

45 WO00/74679, WOO 1/991752, WOO 1/25192, WOO 1/52880, WOO 1/74844, WOO 1/70708, WO01/70337, WO01/91752, WO02/059095, WO02/059107, WO02/059108, WO02/059117, WO02/06276, WO02/12166, WO02/11715, WO02/12178, WO02/15909, WO02/38544, WO02/068387, WO02/068388, WO02/067869, WO02/081430, WO03/06604, WO03/007949, WO03/009847, WO03/009850, WO03/013509, y WO03/031410; moduladores de Mc5r (receptor de la melanocortina 5), tales como aquellos descritos en WO97/19952,

50 WO00/15826, WO00/15790, US20030092041; antagonistas del receptor de la hormona que concentra la melanina 1 (MCHR), tales como T-226296 (Takeda), SB 568849, SNP-7941 (Synaptic), y aquellos descritos en las Publicaciones de Patentes WOO 1/21169, WO01/82925, WO01/87834, WO02/051809, WO02/06245, WO02/076929, WO02/076947, WO02/04433, WO02/51809, WO02/083134, WO02/094799, WO03/004027, WO03/13574, WO03/15769, WO03/028641, WO03/035624, WO03/033476, WO03/033480, JP13226269, y

55 JP1437059; moduladores mGluR5 tales como aquellos descritos en WO03/029210, WO03/047581, WO03/048137, WO03/051315, WO03/051833, WO03/053922, WO03/059904, y similares; agentes serotoninérgicos, tales como fenfloramina (tales como Pondimin® (Bencenoetanamina, N-etil- alfa-metil-3-(trifluorometil)-, clorhidrato), Robbins), dexfenfloramina (tales como Redux® (Bencenoetanamina, N-etil-alfa-metil-3-(trifluorometil)-, clorhidrato), Interneuron) y sibutramina ((Meridia®, Knoll/Reductil™) incluyendo mezclas racémicas, como isómeros ópticamente puros (+) y (-), y sales. solventes, hidratos, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos

60 incluyendo sales de clorhidrato de sibutramina monohidrato de los mismos, y aquellos compuestos descritos en los documentos US4746680, US4806570, y US5436272, US20020006964, WOO 1/27068, y WOO 1/62341; inhibidores del transporte de NE (norepinefrina), tales como GW 320659, despiramina, talsupram, y nomifensina; antagonistas de NPY 1, tales como BIBP3226, J-115814, BIBO 3304, LY-357897, CP-671906, GI- 264879A, y aquellos descritos

65 en los documentos US6001836, WO96/14307, WO01/23387, WO99/51600, WO01/85690, WO01/85098,

WO01/85173, y WO01/89528; antagonistas de NPY5 (neuropéptido Y Y5), tales como 152,804, GW-569180A, GW-594884A, GW-587081X, GW-548118X, FR235208, FR226928, FR240662, FR252384, 1229U91, GI-264879A, CGP71683A, LY-377897, LY-366377, PD-160170, SR-120562A, SR-120819A, JCF-104, y H409/22 y aquellos compuestos descritos en las Publicaciones de Patentes US6140354, US6191160, US6218408, US6258837, US6313298, US6326375, US6329395, US6335345, US6337332, US6329395, US6340683, EP01010691, EP-01044970, WO97/19682, WO97/20820, WO97/20821, WO97/20822, WO97/20823, WO98/27063, WO00/107409, WO00/185714, WO00/185730, WO00/64880, WO00/68197, WO00/69849, WO01/13917, WO01/09120, WO01/14376, WO01/85714, WO01/85730, WO01/07409, WO01/02379, WO01/23388, WO01/23389, WOO 1/44201, WO01/62737, WO01/62738, WO01/09120, WO02/20488, WO02/22592, WO02/48152, WO02/49648, WO02/051806, WO02/094789, WO03/009845, WO3/014083, WO03/022849, WO03/028726 y Norman et al, J. Med. Chem. 43:4288-4312 (2000); antagonistas de opioides, tales como nalmefeno (REVEX ®), 3-metoxinaltrexona, metilnaltrexona, naloxone, y naltrexona (por ejemplo, PT901; Pain Therapeutics, Inc.) y aquellos descritos en los documentos US20050004155 y WO00/21509; antagonistas de la orexina, tales como SB-334867- A y aquellos descritos en las Publicaciones de Patentes WO01/96302, WO01/68609, WO02/44172, WO02/51232, WO02/51838, WO02/089800, WO02/090355, WO03/023561, WO03/032991, y WO03/037847; inhibidores de PDE (por ejemplo, compuestos que ralentizan la degradación de AMP cíclico (cAMP) y/o GMP cíclico (cGMP) por inhibición de las fosfodiesterasas, lo que puede conducir a un aumento relativo de la concentración intracelular de cAMP y cGMP, posibles inhibidores de PDE son principalmente aquellas sustancias que se deben numerar entre la clase que consiste en los inhibidores de PDE3, la clase que consiste en los inhibidores de PDE4 y/o la clase que consiste en los inhibidores de PDE5, en particular aquellas sustancias que pueden designarse como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4 o como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4/5) tales como los descritos en las Publicaciones de Patentes DE1470341, DE2108438, DE2123328, DE2305339, DE2305575, DE2315801, DE2402908, DE2413935, DE2451417, DE2459090, DE2646469, DE2727481, DE2825048, DE2837161, DE2845220, DE2847621, DE2934747, DE3021792, DE3038166, DE3044568, EP000718, EP0008408, EP0010759, EP0059948, EP0075436, EP0096517, EPOI 12987, EPOI 16948, EP0150937, EP0158380, EP0161632, EP0161918, EP0167121, EP0199127, EP0220044, EP0247725, EP0258191, EP0272910, EP0272914, EP0294647, EP0300726, EP0335386, EP0357788, EP0389282, EP0406958, EP0426180, EP0428302, EP043581 1, EP0470805, EP0482208, EP0490823, EP0506194, EP0511865, EP0527117, EP0626939, EP0664289, EP0671389, EP0685474, EP0685475, EP0685479, JP92234389, JP94329652, JP95010875, US4963561, US5141931, WO9117991, WO9200968, WO9212961, WO9307146, WO9315044, WO9315045, WO9318024, WO9319068, WO9319720, WO9319747, WO9319749, WO9319751, WO9325517, WO9402465, WO9406423, WO9412461, WO9420455, WO9422852, WO9425437, WO9427947, WO9500516, WO9501980, WO9503794, WO9504045, WO9504046, WO9505386, WO9508534, WO9509623, WO9509624, WO9509627, WO9509836, WO9514667, WO9514680, WO9514681, WO9517392, WO9517399, WO9519362, WO9522520, WO9524381, WO9527692, WO9528926, WO9535281, WO9535282, WO9600218, WO9601825, WO9602541, WO9611917, DE3142982, DE116676, DE2162096, EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345 US6331543, US20050004222 (incluidos los descritos en las fórmulas I-XIII y los párrafos 37-39, 85-0545 y 557-577), WO9307124, EPO163965, EP0393500, EP0510562, EP0553174, WO9501338 y WO9603399, así como los inhibidores de PDE5 (tales como RX-RA-69, SCH-51866, KT-734, vesnarinona, zaprinast, SKF-96231, ER-21355, BF/GP-385, NM-702 y sildenafil (Viagra™)), inhibidores de PDE4 (tales como etazolato, ICI63197, RP73401, imazolidinona (RO-20-1724), MEM 1414 (R1533/R1500; Pharmacia Roche), denbufilina, rolipram, oxagrelato, nitraquazona, Y-590, DH-6471, SKF-94120, motapizona, lixazinona, indolidan, olprinona, atizoram, KS-506-G, dipamfilina, BMY-43351, atizoram, arofilina, filaminast, PDB-093, UCB-29646, CDP-840, SKF-107806, piclamilast, RS-17597, RS-25344- 000, SB-207499, TIBENELAST, SB-210667, SB-211572, SB-211600, SB-212066, SB-212179, GW-3600, CDP-840, mopidamol, anagrelida, ibudilast, amrinona, pimobendan, cilostazol, quazinona y N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxibenzamida, inhibidores de PDE3 (tales como ICI153, 100, bemorandano (RWJ 22867), MCI-154, UD-CG 212, sulmazol, ampizona, cilostamida, carbazeran, piroximona, imazodan, CI-930, siguazodan, adibendan, saterinona, SKF-95654, SDZ- MKS-492, 349-U-85, emoradan, EMD-53998, EMD-57033, NSP-306, NSP-307, revizinona, NM-702, WIN-62582 y WIN-63291, enoximona y milrinona, inhibidores de PDE3/4 (tales como benafentrina, trequinsina, ORG-30029, zardaverina, L-686398, SDZ-ISQ-844, ORG-20241, EMD-54622 y tolafentrina) y otros inhibidores de PDE (tales como vinpocetina, papaverina, enprofilina, cilomilast, fenoximona, pentoxifilina, roflumilast, tadalafil (Cialis®), teofilina y vardenafil (Levitra®); agonistas de neuropéptido Y2 (NPY2) incluyen, pero no limitando a: polipéptido YY y fragmentos y variantes de los mismos (por ejemplo, YY3-36 (PYY3-36) (N. Engl. J. Med. 349: 941, 2003; IK-PEAPGE DASPEELNRY YASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID NO: XXX)) y agonistas de PYY tales como aquellos descritos en WO02/47712, WO03/026591, WO03/057235, y WO03/027637; inhibidores de la reabsorción de la serotonina, tales como, paroxetina, fluoxetina (Prozac™), fluvoxamina, sertralina, citalopram, e imipramina, y aquellos descritos en los documentos US6162805, US6365633, WO03/00663, WOO1/27060, y WOO1/162341; agonistas de la hormona tiroidea β , tales como KB-2611 (Karo-BioBMS), y aquellos descritos en los documentos WO02/15845, WO97/21993, WO99/00353, GB98/284425, la Solicitud Provisoria de los Estados Unidos No. 60/183,223, y la Solicitud de la Patente Japonesa No. JP 2000256190; activadores de UCP-I (proteína desacoplante-1), 2, o 3, tales como ácido fitánico, ácido 4-[(E)-2-(5, 6,7,8- tetrahydro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-l-propenil]benzoico (TTNPB), ácido retinoico, y aquellos descritos en WO99/00123; agonistas β 3 (receptor beta adrenérgico 3), tales como AJ9677/TAK677 (Dainippon/Takeda), L750355 (Merck), CP331648 (Pfizer), CL-316,243, SB 418790, BRL-37344, L-796568, BMS-196085, BRL-35135A, CGP12177A, BTA-243, GW 427353, Trecadrine, Zeneca D7114, N-5984 (Nisshin Kyorin), LY-377604 (Lilly), SR 59119A, y aquellos descritos en

US5541204, US5770615, US5491134, US5776983, US488064, US5705515, US5451677, WO94/18161, WO95/29159, WO97/46556, WO98/04526 y WO98/32753, WO01/74782, WO02/32897, WO03/014113, WO03/016276, WO03/016307, WO03/024948, WO03/024953 y WO03/037881; agentes noradrenérgicos incluyendo, pero no limitando a, dietilpropion (tal como Tenuate® (1- propanona, 2-(dietilamino)-ifenil-, clorhidrato), Merrell), dextroanfetamina (también conocida como sulfato de dextroanfetamina, dexanfetamina, dexedrina, Dexampex, Ferndex, Oxydess II, Robese, Spancap # 1), mazindol ((o 5-(p-clorofenil)-2,5-dihidro-3Himidazo [2,1-a] isoindol-5-ol) tales como Sanorex®, Novartis o Mazanor®, Wyeth Ayerst), fenilpropanolamina (o Benconometanol, alfa-(1-aminoetil)-, clorhidrato), fentermina ((o fenol, 3-[[4,5-duhidro-1H-imidazol-2-il) etil] (4-metilfenil-1) amino], monoclorhidrato) tales como Adipex-P®, Lemmon, FASTIN®, SmithKline Beecham e Ionamin®, Medeva), fendimetrazina ((o (2S, 3S)-3,4-Dimetil-2fenilmorfolina L-(+)-tartrato (1: 1)) tales como Metra® (Forest), Plegine® (Wyeth-Ay erst), Prelu-2® (Boehringer Ingelheim) y Statobex® (Lemmon), tartrato de fendamina (tales como Thephorin® (2,3,4,9- Tetrahidro-2-metil-9-fenil-1H-indenol [2,1-c] piridina L-(+)-tartrato (1: 1)), Hoffmann-LaRoche), metanfetamina (tales como Desoxin®, Abbot clorhidrato de ((S)-N, (alfa)-dimetilbencenometanamina) y tartrato de fendimetrazina (tales como cápsulas de liberación lenta Bontril®, Tartrato de amarin (-3,4-dimetil-2-fenilmorfolina); sobrerregulador/inductores de la oxidación de los ácidos grasos tales como Famoxin® (Genset); inhibidores de la monoaminoxidasa, incluyendo pero no limitando a befloxtatona, moclobemida, brofaromina, fenoxatina, esuprona, befol, toloxatona, pirlindol, amiflamina, sercloremina, bazinaprina, lazabemida, milacemida, caroxazona y otros compuestos determinados como se describe en el documento WOO 1/12176; y otros agentes antiobesidad tales como agonistas de 5HT-2, inhibidores de ACC (acetil-CoA carboxilasa) tales como los descritos en WO03/072197, ácido alfa-lipoico (alfa-LA), AOD9604, supresores del apetito tales como los de WO03/40107, ATL-962 (Alizyme PLC), benzocaína, clorhidrato de benzfetamina (Didrex), bladderwrack (fucus vesiculosus), agonistas del BRS3 (receptor bombesina subtipo 3), bupropion, cafeína, agonistas de CCK, quitosano, cromo, ácido linoleico conjugado, agonistas de hormonas liberadoras de corticotropina, dehidroepiandrosterona, inhibidores de DGAT1 (diacilglicerol aciltransferasa 1), inhibidores de DGAT2 (diacilglicerol aciltransferasa 2), inhibidores del transportador de dicarboxilatos, efedra, exendina-4 (un inhibidor de glp-1) inhibidores de FAS (ácido graso sintasa) (tales como Cerulenin) y C75), inhibidores de la reabsorción de grasa (tales como los del documento WO03/053451, y similares), inhibidores del transportador de ácidos grasos, fibras naturales solubles en agua (tales como psyllium, plantago, guar, avena, pectina), antagonistas de galanina, galega (Goat's Rue, French Lilac), garcinia cambogia, germander (teucrium chamaedrys), anticuerpos de ghrelina y antagonistas de ghrelina (tales como los descritos en los documentos WO01/87335 y WO02/08250), hormonas polipeptídicas y variantes de las mismas que afectan la secreción de células de islotes, tales como las hormonas del polipéptido inhibidor de secretina/gástrico (GIP)/polipéptido intestinal vasoactivo (VIP)/polipéptido activador de adenilato ciclase pituitaria (PACAP)/polipéptido tipo II de glucagón (GLP-II)/familia de genes glicentin/glucagón y/o los de la familia de genes del polipéptido relacionado con el gen de adrenomedulina/amilina/calcitonina (CGRP) que incluye agonistas de GLP-1 (polipéptido de tipo 1 de glucagón) (por ejemplo, (1) exendina-4, (2) aquellas moléculas de GLP-I descritas en el documento US20050130891 incluyendo GLP-1 (7-34), GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36) o GLP-1 (7-37) en su forma C-terminalmente carboxilada o amidada o como polipéptidos GLP-I modificados y modificaciones de los mismos incluyendo los descritos en los párrafos 17-44 de US20050130891, y se emplean derivados de GLP-1-(7-34) COOH y la amida del ácido correspondiente que tienen la siguiente fórmula general R-NH-HAEGTFTSDVSYLEGQAAKEFIWLVK-CONH2 en la que R = H o un compuesto orgánico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, R es el residuo de un ácido carboxílico. Particularmente preferidos son los siguientes residuos de ácido carboxílico: formilo, acetilo, propionilo, isopropionilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, tert-butilo) y glp-1 (polipéptido similar a glucagón-1), antagonistas de glucocorticoides, inhibidores del transportador de glucosa, secretagogos de hormona del crecimiento (tales como los descritos y descritos específicamente en el documento US5536716), interleuquina-6 (IL-6) y moduladores de los mismos (como en el documento WO03/057237, y similares), L-carnitina, agonistas Mc3r (receptor de melanocortina 3), agonistas/antagonistas MCH2R (hormona concentradora de melanina 2R), antagonistas de la hormona concentradora de melanina, agonistas de melanocortina (tales como Melanotan II o los descritos en los documentos WO 99/64002 y WO 00/74679), nomame herba, inhibidores del transportador de fosfato, compuesto de fitofarma 57 (CP 644,673), piruvato, inhibidores de SCD-I (estearoil-CoA desaturasa-1), T71 (Tularik, Inc., Boulder CO), Topiramato (Topimax®, indicado como un anticonvulsivo que tiene ha demostrado aumentar la pérdida de peso), moduladores del factor de transcripción (tales como los descritos en WO03/026576), inhibidores de β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa-1 (β -HSDI), β -hidroxi- β -metilbutirato, p57 (Pfizer), zonisamida (Zonegran™, indicados como un anti-epiléptico que se ha demostrado que conduce a la pérdida de peso), y los agentes descritos en el documento US200301 19428, párrafos 20-26.

55 1.2.2.7 Inhibidores de la fosfodiesterasa

En ciertas realizaciones, el régimen de terapia de combinación incluye la administración de uno o más inhibidores de fosfodiesterasa ("PDE"). Los inhibidores de PDE ralentizan la degradación de AMP cíclico (cAMP) y/o GMP cíclico (cGMP) inhibiendo las fosfodiesterasas, lo que puede conducir a un aumento relativo en la concentración intracelular de cAMP y/o cGMP. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de PDE que se pueden usar en combinación con los agonistas de GCC de la divulgación incluyen inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4 y/o inhibidores de PDE5, en particular aquellas sustancias que se pueden designar como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4 o como tipos mixtos de inhibidores PDE3/4/5. Ejemplos no limitantes de tales inhibidores de PDE se describen en las siguientes Solicitudes de Patentes y Patentes: DE1470341, DE2108438, DE2123328, DE2305339, DE2305575, DE2315801,

DE2402908, DE2413935, DE2451417, DE2459090, DE2646469, DE2727481, DE2825048, DE2837161, DE2845220, DE2847621, DE2934747, DE3021792, DE3038166, DE3044568, EP000718, EP0008408, EP0010759, EP0059948, EP0075436, EP0096517, EPO1 12987, EPO1 16948, EP0150937, EP0158380, EP0161632, EP0161918, EP0167121, EP0199127, EP0220044, EP0247725, EP0258191, EP0272910, EP0272914, EP0294647, EP0300726, EP0335386, EP0357788, EP0389282, EP0406958, EP0426180, EP0428302, EP0435811, EP0470805, EP0482208, EP0490823, EP0506194, EP0511865, EP0527117, EP0626939, EP0664289, EP0671389, EP0685474, EP0685475, EP0685479, JP92234389, JP94329652, JP95010875, U.S. Pat. Nos. 4,963,561, 5,141,931, WO9117991, WO9200968, WO9212961, WO9307146, WO9315044, WO9315045, WO9318024, WO9319068, WO9319720, WO9319747, WO9319749, WO9319751, WO9325517, WO9402465, WO9406423, WO9412461, WO9420455, WO9422852, WO9425437, WO9427947, WO9500516, WO9501980, WO9503794, WO9504045, WO9504046, WO9505386, WO9508534, WO9509623, WO9509624, WO9509627, WO9509836, WO9514667, WO9514680, WO9514681, WO9517392, WO9517399, WO9519362, WO9522520, WO9524381, WO9527692, WO9528926, WO9535281, WO9535282, WO9600218, WO9601825, WO9602541, WO9611917, DE3142982, DE116676, DE2162096, EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345 US6,331,543, US20050004222 (incluidos los descritos en las fórmulas I-XIII y los párrafos 37-39, 85-0545 y 557-577) y WO9307124, EP0163965, EP0393500, EP0510562, EP0553174, WO9501338 y WO9603399. Los inhibidores de PDE5 que se pueden mencionar a modo de ejemplo son RX-RA-69, SCH-51866, KT-734, vesnarinona, zaprinast, SKF-96231, ER-21355, BF/GP-385, NM-702 y sildenafil (Viagra®). Los inhibidores de PDE4 que se pueden mencionar a modo de ejemplo son RO-20-1724, MEM 1414 (R1533/R1500; Pharmacia Roche), DENBUFYLLINE, ROLIPRAM, OXAGRELATE, NITRAQUAZONE, Y-590, DH-6471, SKF-94120, MOTAPIZONE, LIXAZINONE, INDOLIDAN, OLPRINONE, ATIZORAM, KS-506-G, DIPAMFYLLINE, BMY- 43351, ATIZORAM, AROFYLLINE, FILAMINAST, PDB-093, UCB-29646, CDP-840, SKF- 107806, PICLAMILAST, RS- 17597, RS-25344-000, SB-207499, TIBENELAST, SB-210667, SB-211572, SB-211600, SB-212066, SB-212179, GW- 3600, CDP-840, MOPIDAMOL, ANAGRELIDE, IBUDILAST, AMRINONE, PIMOBENDAN, CILOSTAZOL, QUAZINONE y N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxibenzamida. Los inhibidores de PDE3 que se pueden mencionar a modo de ejemplo son SULMAZOLE, AMPIZONE, CILOSTAMIDE, CARBAZERAN, PIROXIMONE, IMAZODAN, CI-930, SIGUAZODAN, ADIBENDAN, SATERINONE, SKF-95654, SDZ-MKS-492, 349-U-85, EMORADAN, EMD-53998, EMD-57033, NSP-306, NSP-307, REVIZINONE, NM-702, WIN-62582 y WIN-63291, ENOXIMONE y MILRINONE. Los inhibidores de PDE3/4 que se pueden mencionar a modo de ejemplo son BENAFENTRINE, TREQUINSIN, ORG-30029, ZARDAVERINE, L-686398, SDZ-ISQ-844, ORG-20241, EMD-54622 y TOLAFENTRINA. Otros inhibidores de PDE incluyen: cilomilast, pentoxifilina, roflumilast, tadalafil (Cialis®), teofilina y vardenafil (Levitra®), zaprinast (específico de PDE5).

1.2.2.8 Agentes analgésicos

En ciertas realizaciones, el régimen de terapia de combinación incluye la administración de uno o más agentes analgésicos, por ejemplo, un compuesto analgésico o un polipéptido analgésico. En algunas realizaciones, la formulación de agonista de GCC se administra simultáneamente o secuencialmente con uno o más agentes analgésicos. En otras realizaciones, el agonista de GCC está unido covalentemente o unido a un agente analgésico para crear un conjugado terapéutico. Los ejemplos no limitantes de agentes analgésicos que se pueden usar incluyen bloqueadores de los canales de calcio, antagonistas del receptor 5HT (por ejemplo antagonistas del receptor 5HT3, 5HT4 y 5HT1), agonistas del receptor opioide (loperamida, fedotozina y fentanilo), antagonistas del receptor NK1, agonistas del receptor CCK (por ejemplo, loxiglumida), antagonistas del receptor NK1, antagonistas del receptor NK3, inhibidores de la reabsorción de norepinefrina-serotonina (NSRI), agonistas del receptor vaniloide y cannabanoide y sialorfina. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de agentes analgésicos en las diversas clases.

En una realización, el agente analgésico es un polipéptido analgésico seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos relacionados con sialorfina, incluyendo los que comprenden la secuencia de aminoácidos QHNPR (SEQ ID NO: 239), incluyendo: VQHNPR (SEQ ID NO: 240); VRQHNPR (SEQ ID NO: 241); VRGQHNPR (SEQ ID NO: 242); VRGPQHNPR (SEQ ID NO: 243); VRGPRQHNPR (SEQ ID NO: 244); VRGPRRQHNPR (SEQ ID NO: 245); y RQHNPR (SEQ ID NO: 246). Los polipéptidos relacionados con sialorfinas se unen a neprilisina e inhiben la degradación mediada por neprilisina de la sustancia P y Met-enkefalina. De este modo, los compuestos o polipéptidos que son inhibidores de neprilisina son agentes analgésicos útiles que se pueden administrar con los agonistas de GCC descritos en este documento o unidos covalentemente a un agonista de GCC para formar un conjugado terapéutico. La sialorfina y los polipéptidos relacionados se describen en la Patente de los Estados Unidos 6,589,750; U.S. 20030078200 A1 y el documento WO 02/051435 A2.

En otra realización, una formulación agonista de GCC de la divulgación se administra como parte de un régimen de terapia de combinación con un antagonista o agonista del receptor opioide. En una realización, el agonista de GCC y el antagonista o agonista del receptor opioide se unen a través de un enlace covalente. Los ejemplos no limitantes de antagonistas del receptor opioide incluyen naloxona, naltrexona, metil naloxona, nalmefeno, cipridima, beta-funaltrexamina, naloxonazina, naltrindol, nor-binaltorfimina, pentapéptido encefalina (HOE825; Tyr-D-Lys-Gly-Phe-L-homoserina), trimebutina, polipéptido intestinal vasoactivo, gastrina, glucagón. Los ejemplos no limitantes de agonistas del receptor opioide incluyen fedotozina, asimadolina y cetociclazocina, los compuestos descritos en los

documentos WO03/097051 y WO05/007626, morfina, difeniloxilato, frakefamida (H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH 2; WO 01/019849 A1), y loperamida.

Otros ejemplos no limitantes de agentes analgésicos que se pueden usar en un régimen de terapia de combinación junto con las formulaciones de agonistas de GCC de la invención incluyen el dipéptido Tyr-Arg (kytorphin); el polipéptido derivado de cromogranina (CgA 47-66; Véase, por ejemplo, Ghia et al. 2004 Regulatory polypeptides 119:199); agonistas del receptor CCK tales como caerulein; polipéptidos de conotoxina; análogos peptídicos de timulina (solicitud FR 2830451); antagonistas del receptor CCK (CCKa o CCKb), incluyendo loxiglumida y dexloxiglumida (el isómero R de loxiglumida) (WO 88/05774); agonistas de 5-HT4 tales como tegaserod (Zelnorm®), mosaprida, metoclopramida, zacoprida, cisaprida, renzaprida, derivados de bencimidazolona tales como BIMU 1 y BIMU 8, y lilexaprida; bloqueadores del canal de calcio tales como ziconotida y compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, EP625162B1, US 5,364,842, US 5,587,454, US 5,824,645, US 5,859,186, US 5,994,305, US 6,087,091, US 6,136,786, WO 93/13128 A1, EP 1336409 A1, EP 835126 A1, EP 835126 B1, US 5,795,864, US 5,891,849, US 6,054,429, WO 97/01351 A1; antagonistas del receptor NK-1, tales como (Merck & Co Inc), vofopitant, ezlopitant (Pfizer, Inc.), R-673 (Hoffmann-La Roche Ltd), SR-48968 (Sanofi Synthelabo), CP-122,721 (Pfizer, Inc.), GW679769 (Glaxo Smith Kline), TAK-637 (Takeda/Abbot), SR-14033, y compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, EP 873753 A1, US 20010006972 A1, US 20030109417 A1, WO 01/52844 A1 (para una revisión véase Giardina et al. 2003. Drugs 6: 758); antagonistas del receptor NK-2 tales como nepadutant (Menarini Ricerche SpA), saredutant (Sanofi-Synthelabo), GW597599 (Glaxo Smith Kline), SR-144190 (Sanofi-Synthelabo) y UK-290795 (Pfizer Inc); antagonistas del receptor NK3 tales como osanetant (SR-142801; Sanofi-Synthelabo), SSR-241586, talnetant y compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, WO 02/094187 A2, EP 876347 A1, WO 97/21680 A1, US 6,277,862, WO 98/1 1090, WO 95/28418, WO 97/19927, y Boden et al. (J Med Chem. 39:1664-75, 1996); inhibidores de la reabsorción de norepinefrina-serotonina (NSRI) tales como milnaciprán y compuestos relacionados descritos en el documento WO 03/077897; y antagonistas del receptor vanilloide tales como arvanil y compuestos relacionados descritos en el documento WO 01/64212 A1.

Además de los polipéptidos relacionados con las sialorfinas, los polipéptidos analgésicos incluyen: AspPhe, endomorfina-1, endomorfina-2, nocistatina, dalargina, lupron, ziconótida y sustancia P.

1.2.2.9 Insulina y agentes moduladores de la insulina

Los péptidos agonistas de GCC descritos en este documento se pueden usar en terapia de combinación con insulina y compuestos relacionados incluyendo insulina de primate, de roedor o de conejo, incluyendo variantes biológicamente activas de los mismos, incluyendo variantes alélicas, más preferiblemente insulina humana disponible en forma recombinante. Las fuentes de insulina humana incluyen formulaciones farmacéuticamente aceptables y estériles tales como las disponibles de Eli Lilly (Indianapolis, Ind. 46285) como Humulin™ (origen de ADNr de insulina humana). Véase, the PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 55.sup.th Ed. (2001) Medical Economics, Thomson Healthcare (que describe otras insulinas humanas apropiadas).

Los péptidos de GCC descritos en este documento también se pueden usar en terapia de combinación con agentes que pueden potenciar los efectos de la insulina o los niveles de un sujeto tras la administración, por ejemplo, glipizida y/o rosiglitazone. Los polipéptidos y agonistas descritos en este documento se pueden usar en combiterapia con SYMLIN® (acetato de pramlintida) y Exenatide® (exendina-4 sintética, un polipéptido de 39 aa).

1.2.2.10 Agentes antihipertensivos

Los péptidos agonistas de GCC descritos en este documento se pueden usar en terapia de combinación con un agente antihipertensivo que incluye, pero no se limita a: (1) diuréticos, tales como tiazidas, incluyendo clortalidona, clortalizida, diclorofenamida, hidroflumetiazida, indapamida, politiazida e hidroclorotiazida; diuréticos de asa, tales como bumetanida, ácido etacrínico, furosemida y torsemida; agentes ahorradores de potasio, tales como amilorida y triamtereno; inhibidores de anhidrasa carbónica, osmóticos (tales como glicerina) y antagonistas de aldosterona, tales como espironolactona, eprona, y similares; (2) bloqueadores beta-adrenérgicos tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, esmolol, indenolol, metaprolol, nadolol, nebivolol, penbutolol, pindolol, propranolol, sotalol, tertatolol, tilisolol y timolol, y similares; (3) bloqueadores del canal de calcio tales como amlodipina, aranidipina, azelnidipina, barnidipina, benidipina, bepridil, cinaldipina, clevidipina, diltiazem, felodipina, felodipina, gallopamillo, isradipina, lacidipina, lemildipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, manidipina, pranidipina y verapamillo, y similares; (4) inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) tales como benazepril; captopril; ceranapril; cilazapril; delapril; enalapril; enalapril; fosinopril; imidapril; lisinopril; losinopril; moexipril; quinapril; quinaprilato; ramipril; perindopril; perindopril; quanipril; espirapril; tenocapril; trandolapril, y zofenopril, y similares; (5) inhibidores de endopeptidasa neutros tales como omapatrilat, cadoxatril y ecadotril, fosidotril, sampatrilat, AVE7688, ER4030, y similares; (6) antagonistas de endotelina tales como tezostán, A308165 e YM62899, y similares; (7) vasodilatadores tales como hidralazina, clonidina, minoxidil y alcohol nicotínico, y similares; (8) antagonistas del receptor de la angiotensina II, tales como arosartán, candesartán, eprosartán, irbesartán, losartán olmesartán, prazosartán, tasosartán, telmisartán, valsartán y EXP-3137, FI6828K y RNH6270, y similares; (9) bloqueadores α/β adrenérgicos tales como nipradilol, arotinolol y amosulalol, y similares; (10) alfa 1 bloqueadores, tales como

terazosin, urapidil, prazosin, tamsulosin, bunazosin, trimazosin, doxazosin, naftopidil, indoramin, WHP 164, y XENOIO, y similares; (11) agonistas de alfa 2 tales como lofexidina, tiamenidina, moxonidina, rilmenidina y guanobenz, y similares; (12) inhibidores de aldosterona, y similares; y (13) agentes de unión a angiotensina-2 tales como los descritos en el documento WO03/030833. Los agentes antihipertensivos específicos que se pueden usar en combinación con polipéptidos y agonistas descritos en este documento incluyen, pero no están limitados a: diuréticos, tales como tiazidas (por ejemplo, clortalidona, ciclotiazida (CAS RN 2259-96-3), clorotiazida (CAS RN) 72956-09-3, que se puede preparar como se describe en US2809194), diclorofenamida, hidroflumetiazida, indapamida, politiazida, bendroflumetazida, meticlotazida, politiazida, triclorometazida, clortalidona, indapamida, metolazona, quinethazona, altiiazida (CAS RN 5588-16-9, que se puede preparar como se describe en la Patente Británica No. 902,658), benzotiazida (CAS RN 91-33-8, que se puede preparar como se describe en el documento US3 108097), butiazida (que se puede preparar como se describe en las Patentes Británicas Nos. 861, 367) e hidrocortiazida), diuréticos de asa (por ejemplo, bumetanida, ácido etacrínico, furosemida y torasemida), agentes ahorradores de potasio (por ejemplo, amilorida y triamtereno (Número CAS 396-01-0)) y antagonistas de aldosterona (por ejemplo, espironolactona e (número CAS 52-01-7), eiprenona, y similares); bloqueadores β -adrenérgicos tales como amiodarona (Cordarone, Pacerone), clorhidrato de bunolol (CAS RN 31969-05-8, Parke-Davis), acebutolol (\pm N-[3-acetil-4-[2-hidroxi-3-[(1 metiletil) amino] propoxi] fenil]-butanamida, o (\pm)-3'-Acetyl-4' -[2-hidroxi-3-(isopropilamino) propoxi] butiranilida), clorhidrato de acebutolol (por ejemplo Sectral®, Wyeth-Ayerst), clorhidrato de alprenolol (CAS RN 13707-88-5 véase la Solicitud de Patente de los Países Bajos No. 6,605,692), atenolol (por ejemplo, Tenormin®, AstraZeneca), clorhidrato de carteolol (por ejemplo, Cartrol® Filmtab®, Abbott), clorhidrato de celiprolol (CAS RN 57470-78- 7, véase también en US4034009), clorhidrato de cetamolol (CAS RN 77590-95-5, véase también US4059622), clorhidrato de labeltolol (por ejemplo, Normodyne®, Schering), clorhidrato de esmolol (por ejemplo, Brevibloc®, Baxter), clorhidrato de levobetaxolol (por ejemplo, Betaxon™ Suspensión oftálmica, Alcon), clorhidrato de levobunolol (por ejemplo, Betagan® Liquifilm® con C CAP® Compliance Cap, Allergan), nadolol (por ejemplo, Nadolol, Mylan), practolol (CAS RN 6673-35-4, véase también US3408387), clorhidrato de propranolol (CAS RN 318-98-9), clorhidrato de sotalol (por ejemplo, Betapace AF™, Berlex), timolol (2-Propanol, 1-[(1,1-dimetiletil) amino]-3-[[4-(4-morfolinil)-1,2,5-tiadiazol-3-il] oxil]-, hemihidrato, (S)-, CAS RN 91524-16-2), timolol maleato (S)-I-[(1,1-dimetiletil) amino]-3-[[4-(4-morfolinil)-1,2,5 -thiadiazol -3- il] oxil]-2-propanol (Z)-2-butenodioato (1: 1) sal, CAS RN 26921-17-5), bisoprolol (2-Propanol, 1-[4-[[2-(1-metiletoxi) etoxil]-metil] fenoxil]-3-[(1-metiletil) amino]-, (\pm), CAS RN 66722-44-9), fumarato de bisoprolol (tales como (\pm)-1-[4-[[2-(1-Metiletoxi) etoxil] metil] fenoxil]-3-[(1-metiletil) amino]-2-propanol (E)-2-butenodioato (2: 1) (sal), por ejemplo, Zebeta™, Lederle Consumer), nebivalol (2H-1-Benzopiran-2-metanol, α α' -[iminobis (metileno)] bis [6-fluoro-3,4-dihidro-, CAS RN 99200-09 -6, véase también la Patente de los Estados Unidos No. 4,654,362), clorhidrato de cicloprolol, tal como 2-Propanol, 1-[4-[2-(ciclopropilmetoxi) etoxil] fenoxil]-3-[1-metiletil) amino]-, clorhidrato, A.A.S RN 63686-79-3), clorhidrato de dexpropranolol (2-propanol, 1-[1-metiletil)-amino]-3-(1-naftaleniloxi)-clorhidrato (CAS RN 13071-11-9), clorhidrato de diacetolol (Acetamida, N-[3-acetil-4-[2-hidroxi-3-[(1-metil-etil) amino] propoxil] [fenil]-, monoclorhidrato CAS RN 69796-04-9), clorhidrato de dilevalol (Benzamida, 2- hidroxi-5-[1-hidroxi-2-[1-metil-3-fenilpropil) amino] etil]-, monoclorhidrato, CAS RN 75659-08-4), clorhidrato de exaprolol (2-Propanol, 1-(2-ciclohexilfenoxi)-3-[(1-metiletil) amino]-, clorhidrato CAS RN 59333-90-3), sulfato de flestolol (ácido benzoico, 2-fluoro-, éster 3-[[2-[aminocarbonil) amino]-dimetiletil] amino]-2-hidroxi-propílico, (+)-sulfato (1: 1) (sal), CAS RN 88844-73-9; clorhidrato de metalol (metanosulfonamida, N-[4-[1-hidroxi-2-(metilamino) propil] fenil]-, monoclorhidrato CAS RN 7701-65-7), metoprolol 2-Propanol, 1-[4-(2-metoxietil) fenoxil]-3-[1-metiletil) amino]-; CAS RN 37350-58-6), tartrato de metoprolol (tales como 2-Propanol, 1-[4-(2-metoxietil) fenoxil]-3-[(1-metiletil) amino]-, por ejemplo, Lopressor®, Novartis), sulfato de pamatolol (ácido carbámico, [2-[4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil) amino] propoxil] fenil]-etil]-, éster metílico, (\pm) sulfato (sal) (2: 1), CAS RN 59954-01-7), sulfato de penbutolol (2-propanol, 1-(2-ciclopentilfenoxi)-3-[(1,1-dimetiletil) amino] 1, (S)-, sulfato (2 : 1) (sal), CAS RN 38363-32-5), practolol (Acetamida, N-[4-[2- hidroxi-3-[(1-metiletil) amino]-propoxil] fenil]-, CAS RN 6673 -35-4); clorhidrato de tiprenolol (Propanol, 1-[(1-metiletil) amino]-3-[2-(metiltio)-fenoxil]-, clorhidrato, (\pm), CAS RN 39832-43-4), tolamolol (benzamida, 4-[2-[[2-hidroxi-3-(2-metilfenoxi)-propil] amino] etoxil]-, CAS RN 38103-61-6), bopindolol, indenolol, pindolol, propanolol, tertatolol, y tilisolol, y similares; bloqueadores de los canales de calcio tales como la sal de besilato de amlodipina (tales como 3-etil-5-metil-2-(2-aminoetoximetil)-4-(2-clorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridinadicarboxilato bencenosulfonato, por ejemplo, Norvasc®, Pfizer), maleato de clentiazem (1,5-Benzotiazepin-4 (5H)-ona, 3-(acetiloxi)-8-cloro-5-[2-(dimetilamino) etil]-2,3-dihidro-2-(4-metoxifenil)-(2S-cis)-, (Z)-2-butenodioato (1: 1), véase también US4567195), isradipina (ácido 3,5-piridinadicarboxílico, 4-(4-benzofurazanil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-, metil 1-metiletil éster, (\pm)-4(4-benzofurazanil)- 1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridinadicarboxilato, véase también US4466972); nimodipina (tal como isopropil (2- metoxietil) 1,4- dihidro -2,6- dimetil -4-(3-nitrofenil)-3,5-piridina-dicarboxilato, por ejemplo, Nimotop®, Bayer), felodipina (tal como etil metil 4-(2,3-diclorofenil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridinadicarboxilato-, por ejemplo, Plendil® Liberación prolongada, AstraZeneca LP), nilvadipina (ácido 3,5-piridinadicarboxílico, 2-ciano-1,4-dihidro-6-metil-4-(3-nitrofenil)-,3-metil 5-(1-metiletil) éster, también véase US3799934), nifedipina (tal como ácido 3, 5 -piridinadicarboxílico,1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, dimetil éster, por ejemplo, Procardia XL® comprimidos de liberación prolongada, Pfizer), clorhidrato de diltiazem (tal como 1,5-Benzotiazepin-4(5H)-ona,3-(acetiloxi)-5[2-(dimetilamino)etil]-2,-3-dihidro-2(4-metoxifenil)-, monoclorhidrato, (+)-cis., por ejemplo, Tiazac®, Forest), clorhidrato de verapamilol (tal como bencenoacetronitrilo, (alfa)-[[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil) etil] metilamino] propil]-3,4-dimetoxi-(alfa)-(1-metiletil) clorhidrato, por ejemplo, Isoptin® SR, Knoll Labs), clorhidrato de teludipina (ácido 3,5-piridinadicarboxílico, 2-[(dimetilamino) metil] 4-[2-[(1E)-3-(1,1-dimetiletoxi)-3- oxo-1-propenil] fenil]-1,4-dihidro-6-metil-, dietil éster, monoclorhidrato) CAS RN 108700-03-4), belfosdil (ácido fosfónico, [2-(2-fenoxi etilo)-1, 3 -propano-dil] bis-, éster de tetrabutilo CAS RN 103486-79-9), fostedil

(ácido fosfónico, [[4-(2-benzotiazolil) fenil] metil]-, éster dietílico CAS RN 75889-62-2), aranidipina, azelnidipina, barnidipina, benidipina, bepridil, cinaldipina, clevidipina, efonidipina, gallopamilo, lacidipina, lemildipina, lercanidipina, monatepil maleato (1-piperazinabutanamida, N-(6,11-dihidrodibenzo (b, e) tiepina-11-il) 4-(4-fluorofenil)-, (+)-, (Z)-2-butenodioato (1: 1) (±)-N-(6,11-Dihidrodibenzo(b, e) tiep-in-11 -il)-4-(p-fluorofenil)-1-piperazinabutiramida maleato (1: 1) CAS RN 132046-06-1), nicardipina, nisoldipina, nitrendipina, manidipina, pranidipina, y similares; antagonistas del canal del calcio T tales como mibefradil; inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) tales como benazepril, clorhidrato de benazepril (tales como ácido 3-[[1-(etoxicarbonil)-3-fenil-(1S)-propil] amino]-2,3, 4,5-tetrahidro-2-oxo-1 H-1-(3 S)-benzazepina-1-acético monoclorhidrato, por ejemplo, Lotrel®, Novartis), captopril (tal como 1-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina, por ejemplo, Captopril, Mylan, CAS RN 62571-86-2 y otros descritos en US4046889), ceranapril (y otros descritos en US4452790), cetapril (alacepril, Dainippon descrito en Eur. Therap. Res. 39: 671 (1986); 40: 543 (1986)), cilazapril (Hoffman-LaRoche) descrito en J. Cardiovasc. Pharmacol. 9:39 (1987), indalapril (clorhidrato de delapril (2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida, 3-biciclo [2.2.1] hept-5-en-2-il-6-cloro-3, 4-dihidro-, 1,1-dióxido CAS RN 2259-96-3), descrito en US4385051), enalapril (y otros descritos en US4374829), enalapril, enalaprilato, fosinopril (tales como L-prolina, 4-ciclohexil-1-[[[2-metil 1-(1-oxopropoxi) propoxi] (4-fenilbutil) fosfinil] acetil]-, sal sódica, por ejemplo, Monopril, Bristol-Myers Squibb y otros descritos en US4168267), fosinopril sódico (L-Prolina, 4-ciclohexil-1-[[[R)-[(1S)-2-metil-1-(1-oxopropoxi) propoxi], imidapril, indolapril (Schering, descrito en J. Cardiovasc. Pharmacol. 5: 643, 655 (1983)), lisinopril (Merck), losinopril, moexipril, clorhidrato de moexipril (ácido 3-isoquinolincarboxílico, 2-[(2S)-2-[(1S)-1-(etoxicarbonil)-3-fenilpropil] amino]-1-oxopropil]-1-,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi, monoclorhidrato, (3S)-CAS RN 82586-52-5), quinapril, quinaprilato, ramipril (Hoechst) descrito en el documento EP 79022 y Curr. Ther. Res. 40:74 (1986), perindopril erbumina (tal como ácido 2S, 3aS, 7aS- 1-[(S)-N-(S)-1-Carboxibutilalanilhexahidro[^]-indolinocarboxílico, 1-etil éster, compuesto con tert-butilamina (1: 1), por ejemplo, Aceon®, Solvay), perindopril (Servier, descrito en Eur. J. Clin. Pharmacol., 31: 519 (1987)), quanipril (descrito en US4344949), espirapril (Schering, descrito en Acta. Pharmacol. Toxicol. 59 (Supp. 5): 173 (1986)), tenocapril, trandolapril, zofenopril (y otros descritos en US4316906), rentiapril (fentiapril, descritos en Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 10:131 (1983)), pivopril, YS980, teprotida (potenciador de la bradiquinina BPP9a CAS RN 35115-60-7), BRL 36,378 (Smith Kline Beecham, véase EP80822 y EP60668), MC-838 (Chugai, véase CA. 102:72588v y Jap. J. Pharmacol. 40:373 (1986), CGS 14824 (Ciba-Geigy, ácido 3-[[1-etoxicarbonil-3-fenil-(1S)-propil]] amino)-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1-(3S)-benzazepina-1 acético HCl, véase la Patente del Reino Unido No. 2103614), CGS 16,617 (Ciba-Geigy, ácido 3(S)-[[[(1S)-5-amino-1-carboxipentil] amino]-2,3,4-5-tetrahidro-2-oxo-1H-1-benzazepina-1-etanoico, véase el documento US4473575), Ru 44570 (Hoechst, véase Arzneimittelforschung 34:1254 (1985)), R 31-2201 (Hoffman-LaRoche véase FEBS Lett. 165:201 (1984)), C1925 (Pharmacologist 26:243, 266 (1984)), WY-44221 (Wyeth, véase J. Med. Chem. 26:394 (1983)), y aquellos descritos en el documento US2003006922 (párrafo 28), US4337201, US4432971 (fosfonamidatos); inhibidores de endopeptidasa neutra tales como omapatrilat (Vanlev®), CGS 30440, cadoxatril y ecadotril, fasidotril (también conocido como aladotril o alatriopril), sampatrilat, mixanpril y gemopatrilat, AVE7688, ER4030, y los descritos en US5362727, US5366973, US5225401, US4722810, US5223516, US4749688, US5552397, US5504080, US5612359, US5525723, EP0599444, EP0481522, EP0599444, EP0595610, EP0534363, EP534396, EP534492, EP0629627; antagonistas de endotelina tales como tezoseptán, A308165 e YM62899 y similares; vasodilatadores tales como hidralazina (apresolina), clonidina (clorhidrato de clonidina (1H-Imidazol-2-amina, N-(2,6-diclorofenil)4,5-dihidro-, monoclorhidrato CAS RN 4205-91-8), catapres, minoxidil (Loniten), alcohol nicotínico (roniacol), clorhidrato de diltiazem (tal como 1,5-Benzotiazepin-4 (5H)-ona, 3-(acetiloxi)-5 [2-(dimetilamino) etil]-2, -3-dihidro -2 (4-metoxifenil)-, monoclorhidrato, (+)-cis, por ejemplo, Tiazac®, Forest), dinitrato de isosorbida (tal como 1,4: 3,6-dianhidro-D-glucitol 2,5-dinitrato, por ejemplo, Isordil® Titradose®, Wyeth-Ayerst), mononitrato de isosorbida (tal como 1,4: 3,6-dianhidro-D-glucitol-1,5-nitrato, un nitrato orgánico, por ejemplo, Ismo®, Wyeth-Ayerst), nitroglicerina (tal como, 2,3-propanetriol-trinitrato, por ejemplo, Nitrostat® Parke-Davis), clorhidrato de verapamilo (tal como benceacetoneitrilo, (6)-(alfa) [3-[[2-(3,4-dimetoxifenil) etil] metilamino] propil]-3,4-dimetoxi-(alfa)-(1-metiletil) clorhidrato, por ejemplo, Covera HS® Liberación prolongada, Searle), cromonar (que puede ser preparado como se describe en US3282938), clonitato (Annalen 1870 155), droprenilamina (que se puede preparar como se describe en DE25211 13), lidoflazina (que se puede preparar como se describe en US3267104); prenilamina (que se puede preparar como se describe en el documento US3152173), nitrato de propatilo (que se puede preparar como se describe en la Patente de Francia No. 1,103,113), clorhidrato de mioflazina (1 -Piperazinacetamida, 3-(aminocarbonil) 4-[4,4-bis (4-fluorofenil) butil]-N-(2,6-diclorofenil)-, diclorhidrato CAS RN 83898-67-3), mixidina (bencenoetanamina, 3,4-dimetoxi-N-(1-metil-2-pirrolidinilideno)-Pirrolidina, 2-[(3,4-dimetoxifenetil) imino]-1-metil-1-metil-2-[(3, 4-dimetoxifenetil) imino] pirrolidina CAS RN 27737-38-8), molsidomina (1,2, 3-oxadiazolio, 5-(etoxicarbonil) amino]-3-(4-morfolinil)-, sal interna CAS RN 25717-80-0), mononitrato de isosorbida (D-glucitol, 1,4: 3,6-dianhidro-, 5-nitrato CAS RN 16051-77-7), tetranitrato de eritritilo (1,2,3,4-butanotetrol, tetranitrato, (2R, 3S) -rel-CAS RN 7297-25-8), clonitrato (1,2-propanodiol, 3-cloro-, dinitrato (7Cl, 8Cl, 9Cl) CAS RN 2612-33-1), dipiridamol etanol, 2,2', 2'', 2''' - [(4,8-di-1-piperidinilpirimido [5,4-d] pirimidin-2,6-diil)dinitril] tetrakis-CAS RN 58-32-2), nicorandil (CAS RN 65141-46-0 3-), Nisoldipina ácido piridincarboxamida (N- [2- (nitrooxi) etil]- 3,5-piridinadicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4- (2-nitrofenil) -, metil 2-metilpropil éster CAS RN 63675-72-9), nifedipina ácido 3,5-piridinadicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4- (2-nitrofenil) -, dimetil éster CAS RN 21829-25- 4), maleato de perhexilina (piperidina, 2- (2,2-diciclohexiletil) -, (2Z) -2-butenodioato (1: 1) CAS RN 6724-53-4), clorhidrato de oxprenolol (2-Propanol, 1- [(1-metiletil) amino] -3- [2- (2-propeniloxi) fenoxi]-, clorhidrato CAS RN 6452-73-9), pentrinitrol (1,3-propanodiol, 2,2-bis [(nitrooxi) metil]-, mononitrato (éster) CAS RN 1607-17-6), verapamilo (Bencenoacetoneitrilo, α- [3-[[2- (3,4-dimetoxifenil) etil]-metilamino] propil] -3 , 4-dimetoxi-α- (1-metiletil) -CAS RN 52-53-9) y similares; antagonistas del receptor de

angiotensina II tales como, aprosartán, zolasartán, olmesartán, prazosartán, FI6828K, RNH6270, candesartán (ácido 1H-bencimidazol-7-carboxílico, 2-etoxi-1- [[2'-(1H-tetrazol-5-il)] [1,1'-bifenil] 4-il] metil]-CAS RN 139481-59-7), candesartán cilexetil ((+/-)-1-(ciclohexilcarboniloxi)etil-2-etoxi-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]-1H-bencimidazolcarboxilato, CAS RN 145040-37-5, US5703110 y US5196444), eprosartán (ácido 3- [1-4-carboxifenilmetil] -2- n-butil-imidazol-5-il)-(2-tienilmetil) propenoico, US5185351 y US5650650), irbesartán (2-n-butil-3- [[2'-(1H-tetrazol-5-il) bifenil-4-il] metil] 1, 3-diazazspiro [4,4] non-1-en-4-ona, US5270317 y US5352788), losartán (2-N-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il) bifenil-4-il]-metil] imidazol, sal de potasio, US5138069, US5153197 y US5128355), tasosartán (5,8-dihidro-2,4-dimetil-8-[[2'-(1H-tetrazol-5-il) [1, r-bifenil] 4-il] metil] -pirido [2,3-d] pirimidin-7(6H)-ona, US5149699), telmisartán ácido (4'- [(1,4-dimetil-2'-propil-(2,6'-bi-1H-bencimidazol) -r-il)]-[1,1'-bifenil] -2-carboxílico, CAS RN 144701-48-4, US5591762), milfasartán, abitesartán, valsartán (Diovan® (Novartis), (S)-NvalerilN-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]valina, US5399578), EXP-3137 (ácido 2-N-butil-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]-metil]imidazol-5-carboxílico, US5138069, US5153197 y US5128355), 3-(2'-(tetrazol-5-il)-l,r-bifen-4-il)metil-5,7-dimetil-2-etil-3H-imidazo[4,5-b]piridina, ácido 4[[2-etil-4-metil-6-(5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridin-2-il)-benzimidazol-1-il]-metil]-1,r-bifenil]-2- carboxílico, 2-butil-6-(1-metoxi-1-metiletil)-2-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil] guinazolin-4(3H)-ona, 3-[[2'-carboxibifenil-4-il]metil]-2-ciclopropil-7-metil-3H-imidazo[4,5-b]piridina, ácido 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]imidazol-carboxílico, ácido 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il) [1, 1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-carboxílico -1-(etoxicarbonil-oxi)etil éster sal de potasio, dipotasio 2-butil-4-(metiltio)-1-[[2-[[[(propilamino)carbonil]amino]-sulfonil](1,1'-bifenil)-4-il]metil]-1H-imidazol-5-carboxilato, metil-2-[[4-butil-2-metil-6-oxo-5-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1-(6H)- pirimidinil]metil]-3-tiofenocarboxilato, 5-[(3,5-dibutil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]-2-[2-(1H-tetrazol-5-ilfenil)]piridina, 6-butil-2-(2-feniletil)-5 [[2'-(1H-tetrazol-5 -il)[1,1'- bifenil]-4-metil]pirimidin-4-(3H)-ona sal D,L lisina, 5-metil-7-n-propil-8-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-[1,2,4]-triazolo[1,5-c]pirimidin-2(3H)-ona, 2,7-dietil-5-[[2'-(5-tetrazol)bifenil-4-il]metil]-5H-pirazolo[1,5-b][1,2,4]triazol sal de potasio, ácido 2-[2- butil-4,5-dihidro-4-oxo-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-4-bifenilmetil]-3H-imidazo[4,5-c]piridina-5-ilmetil] benzoico, etil éster, sal de potasio, 3-metoxi-2,6-dimetil-4[[2'-(1H-tetrazol-5-il)-1,1'-bifenil-4-il]metoxi] piridina, ácido 2-etoxi-1-[[2'-(5-oxo-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-3-il)bifenil-4-il]metil]-1H-benzimidazol-7-carboxílico, ácido 1-[N-(2' -(1H- tetrazol-5-il)bifenil-4-il-metil)-N-valerolilaminometil]ciclopentano- 1 - carboxílico, 7- metil-2n-propil-3-[[2' 1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-3H-imidazo[4,5-6]piridina, benzoato de 2-[5-[[2-etil-5,7-dimetil-3H-imidazo[4,5-b]piridina-3-il)metil]-2-quinolinil]sodio, 2-butil-6-cloro-4-hidroximetil-5 -metil-3-[[2'-(1H-tetrazol-5 -il)bifenil-4-il]metil]piridina, ácido 2-[[[2-butil-1-[[4-carboxifenil]metil]-1 H-imidazol-5-il]metil]amino]benzoico tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]pirimidin-6-ona, 4(S)-[4-(carboximetil)phenoxi]-N-[2(R)-[4-(2-sulfobenzamido)imidazol- 1 - il]octanoil]-L-prolina, 1 -(2,6-dimetilfenil)-4-butil-1,3-dihidro-3-[[6-[2-(1H-tetrazol-5-il)fenil]-3-piridinil]metil]-2H-imidazol-2-ona, 5,8-etano-5,8-dimetil-2-n-propil-5,6,7,8-tetrahidro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-1H,4H-1,3,4a,8a-tetrazaciclopentanaftaleno-9-ona, 4-[1-[2'-(1,2,3,4-tetrazol-5-il)bifen-4-il]metilamino]-5,6,7,8-tetrahidro-2-trifilquinazolina, 2-(2-clorobenzoil)imino-5-eti)-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil-1,3,4-tiadiazolina, ácido 2-[5-etil-3-[2-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-1,3,4-tiazolina-2-ilideno]aminocarbonil-1-ciclopentencarboxílico sal de dipotasio, y ácido 2-butil-4-[N-metil-N-(3 -metilcrotonilamino)-1-[[2'-(1 H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]amino]benzoico 1 H- imidazol-5 - carboxílico 1-etoxicarboniloxietil éster, los descritos en las Publicaciones de Patentes EP475206, EP497150, EP539086, EP539713, EP535463, EP535465, EP542059, EP497121, EP535420, EP407342, EP415886, EP424317, EP435827, EP433983, EP475898, EP490820, EP528762, EP324377, EP323841, EP420237, EP500297, EP426021, EP480204, EP429257, EP430709, EP434249, EP446062, EP505954, EP524217, EP514197, EP514198, EP514193, EP514192, EP450566, EP468372, EP485929, EP503162, EP533058, EP467207, EP399731, EP399732, EP412848, EP453210, EP456442, EP470794, EP470795, EP495626, EP495627, EP499414, EP499416, EP499415, EP511791, EP516392, EP520723, EP520724, EP539066, EP438869, EP505893, EP530702, EP400835, EP400974, EP401030, EP407102, EP411766, EP409332, EP412594, EP419048, EP480659, EP481614, EP490587, EP467715, EP479479, EP502725, EP503838, EP505098, EP505111, EP513,979 EP507594, EP510812, EP511767, EP512675, EP512676, EP512870, EP517357, EP537937, EP534706, EP527534, EP540356, EP461040, EP540039, EP465368, EP498723, EP498722, EP498721, EP515265, EP503785, EP501892, EP519831, EP532410, EP498361, EP432737, EP504888, EP508393, EP508445, EP403159, EP403158, EP425211, EP427463, EP437103, EP481448, EP488532, EP501269, EP500409, EP540400, EP005528, EP028834, EP028833, EP411507, EP425921, EP430300, EP434038, EP442473, EP443568, EP445811, EP459136, EP483683, EP518033, EP520423, EP531876, EP531874, EP392317, EP468470, EP470543, EP502314, EP529253, EP543263, EP540209, EP449699, EP465323, EP521768, EP415594, WO92/14468, WO93/08171, WO93/08169, WO91/00277, WO91/00281, WO91/14367, WO92/00067, WO92/00977, WO92/20342, WO93/04045, WO93/04046, WO91/15206, WO92/14714, WO92/09600, WO92/16552, WO93/05025, WO93/03018, WO91/07404, WO92/02508, WO92/13853, WO91/19697, WO91/11909, WO91/12001, WO91/11999, WO91/15209, WO91/15479, WO92/20687, WO92/20662, WO92/20661, WO93/01177, WO91/14679, WO91/13063, WO92/13564, WO91/17148, WO91/18888, WO91/19715, WO92/02257, WO92/04335, WO92/05161, WO92/07852, WO92/15577, WO93/03033, WO91/16313, WO92/00068, WO92/02510, WO92/09278, WO92/10179, WO92/10180, WO92/10186, WO92/10181, WO92/10097, WO92/10183, WO92/10182, WO92/10187, WO92/10184, WO92/10188, WO92/10180, WO92/10185, WO92/20651, WO93/03722, WO93/06828, WO93/03040, WO92/19211, WO92/22533, WO92/06081, WO92/05784, WO93/00341, WO92/04343, WO92/04059, US5104877, US5187168, US5149699, US5185340, US4880804, US5138069, US4916129, US5153197, US5173494, US5137906, US5155126, US5140037, US5137902, US5157026, US5053329, US5132216, US5057522, US5066586, US5089626, US5049565, US5087702, US5124335, US5102880, US5128327, US5151435, US5202322, US5187159, US5198438, US5182288, US5036048, US5140036, US5087634, US5196537,

US5153347, US5191086, US5190942, US5177097, US5212177, US5208234, US5208235, US5212195, US5130439, US5045540, US5041152, y US5210204, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; bloqueadores α/β adrenérgicos, tales como nipradilol, arotinolol, amosulalol, tosilato de bretilio (CAS RN: 61-75-6), mesilato de dihidroergtamina (tal como ergotaman-3', 6', 18-triona, 9, -10-dihidro- 12'-hidroxi-2'-metil-5'-(fenilmetil)-, (5' (α)), monometanosulfonato, por ejemplo, Inyección DHE 45®, Novartis), carvedilol (tal como (\pm)-1-(Carbazol-4-iloxi)-3-[[2-(o-metoxifenoxi) etil] amino]-2-propanol, por ejemplo, Coreg®, SmithKline Beecham), labetalol (tal como 5-[1-hidroxi-2-[(1-metil-3-fenilpropil) amino] etil]salicilamida monoclóhidrato, por ejemplo, Normodyne®, Schering), tosilato de bretilio (Bencenometanaminio, 2-bromo-N-etil-N,N-dimetil-, sal con ácido 4-metilbencenosulfónico (1 :1) CAS RN 61-75-6), mesilato de fentolamina (Fenol, 3-[[[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil]-(4-metilfenil)amino]-, monometanosulfonato (sal) CAS RN 65-28-1), tartrato de solipertina (5H-1,3-Dioxo) [4,5-f]indol, 7-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil] etil]-, (2R,3R)-2,3-dihidroxi-butanodioato (1 :1) CAS RN 5591-43-5), clorhidrato de zolertina (Piperazina, 1-fenil-4-[2-(1H-tetrazol-5-il)etil]-, monoclóhidrato (8Cl, 9Cl) CAS RN 7241-94-3) y similares; bloqueadores de receptores α adrenérgicos, tales como alfuzosín (CAS RN: 81403-68-1), terazosín, urapidil, prazosín (Minipress®), tamsulosín, bunazosín, trimazosín, doxazosín, naftopidil, indoramín, WHP 164, XENOIO, clorhidrato de fenspirida (que pueden prepararse como se describe en el documento US3399192), proroxán (CAS RN 33743-96-3), y clorhidrato de labetalol y combinaciones de los mismos; agonistas de α_2 tales como metildopa, metildopa HCL, lofexidina, tiamenidina, moxonidina, rilmenidina, guanobenz, y similares; inhibidores de aldosterona, y similares; inhibidores de renina incluyendo Aliskiren (SPPIOO; Novartis/Speedel); agentes de unión a angiopoyetina 2 tales como los descritos en el documento WO03/030833; agentes antianginosos, tales como ranolazina (clorhidrato de 1-piperazinacetamida, N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil]-, diclorhidrato CAS RN 95635-56-6), clorhidrato de betaxolol (2-propanol, 1-[4-[2(ciclopropilmetoxi)etil]fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-, clorhidrato CAS RN 63659-19-8), clorhidrato de butoprozina (metanona, [4-[3(dibutilamino)propoxil]fenil][2-etil-3-indolincil)-, monoclóhidrato CAS RN 62134-34-3), ácido cinepazet maleatel-piperazinacético, 4-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-, etil éster, (2Z)-2-butenodioato (1:1) CAS RN 50679-07-7), tosifeno (bencenosulfonamida, 4-metil-N-[[[(1S)-1-metil-2-feniletil]amino]carbonil]-CAS RN 32295-184), clorhidrato de verapamilo (bencenoacetónitrilo, α -[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi- α -(1-metiletil)-, monoclóhidrato CAS RN 152-114), molsidomina (1,2,3-oxadiazolio, 5-[(etoxicarbonil)amino]-3-(4-morfolinil)-, sal interna CAS RN 25717-80-0), y clorhidrato de ranolazina (1-piperazinacetamida, N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil]-, diclorhidrato CAS RN 95635-56-6); tosifeno (bencenosulfonamida, 4-metil-N-[[[(1S)-1-metil-2-feniletil]amino]carbonil]-CAS RN 32295-184); estimulantes adrenérgicos tales como clorhidrato de guanfacina (tal como N-amidino-2-(2,6-diclorofenil) clorhidrato de acetamida, por ejemplo comprimidos Tenex® disponibles en Robins); metildopahidroclorotiazida (tal como levo-3-(3,4-dihidroxiifenil)-2-metilalanina) combinado con hidroclorotiazida (tal como 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida 1,1-dióxido, por ejemplo la combinación como por ejemplo comprimidos Aldoril® disponibles en Merck), metildopaclorotiazida (tal como 6-cloro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida 1,1-dióxido y metildopa como se ha descrito anteriormente, por ejemplo Aldoclor®, Merck), clorhidrato de clonidina (tal como clorhidrato de 2-(2,6-diclorofenilamino)-2-imidazolina y clortalidona (tal como 2-cloro-5-(1-hidroxi-3-oxo-1-isoindolinil) bencenosulfonamida), por ejemplo Combipres®, Boehringer Ingelheim), clorhidrato de clonidina (tal como clorhidrato de 2-(2,6-diclorofenilamino)-2-imidazolina, por ejemplo Catapres®, Boehringer Ingelheim), clonidina (1H-imidazol-2-amina, N-(2,6-diclorofenil)4,5-dihidro- CAS RN 4205-90-7), Hyzaar (Merck; una combinación de losartán e hidroclorotiazida), Co-Diovan (Novartis; una combinación de valsartán e hidroclorotiazida, Lotrel (Novartis; un combinación de benazepril y amlodipina) y Caduet (Pfizer; una combinación de amlodipina y atorvastatina), y los agentes descritos en el documento US20030069221.

1.2.2.11 Agentes para el tratamiento de los trastornos respiratorios

Los péptidos agonistas de GCC descritos en este documento se pueden usar en terapia de combinación con uno o más de los siguientes agentes útiles en el tratamiento de trastornos respiratorios y de otro tipo incluyendo, pero no limitando a: (1) β -agonistas incluyendo, pero no limitando a: albuterol (PROVENTIL®, SALBUTAMOL®, VENTOLIN®), bambuterol, bitoterol, clenbuterol, fenoterol, formoterol, isoetarina (BRONKOSOL®, BRONKOMETER®), metaproterenol (ALUPENT®, METAPREL®), pirbuterol (MAXAIR®), reproterol, rimiterol, salmeterol, terbutalina (BRETHAIRE®, BRETHINE®, BRICANYL®), adrenalina, isoproterenol (ISUPREL®), epinefrina bitartrato (PRIMATENE®), efedrina, orciprenlina, fenoterol e isoetarina; (2) esteroides, incluyendo, pero no limitando a beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, budesonida, budesonida, butixocort, dexametasona, flunisolida, fluocortina, fluticasona, hidrocortisona, metil prednisona, mometasona, predonisolona, predonisona, tipredán, tixocortal, triamcinolona y acetónido de triamcinolona; (3) combinaciones de β_2 -agonistas-corticoesteroides [por ejemplo, salmeterol-fluticasona (ADVAIR®), formoterol-budesonida (SYMBICORT®)]; (4) antagonistas de receptores de leucotrienos D4/antagonistas de leucotrienos/antagonistas de LTD4 (esto es, cualquier compuesto que sea capaz de bloquear, inhibir, reducir o, de otra manera, interrumpir la interacción entre los leucotrienos y el receptor LTI de Cys) incluyendo, pero no limitando a: zafilukast, montelukast, montelukast sódico (SINGULAIR®), pranlukast, iralukast, pobilukast, SKB-106.203 y los compuestos descritos como que tienen actividad antagonizante de LTD4 descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5,565,473; (5) inhibidores de 5-lipoxigenasa y/o inhibidores de la biosíntesis de leucotrienos [por ejemplo, zileutón y BAY1005 (CA registro 128253-31-6)]; (6) antagonistas del receptor de histamina H1/antihistaminas (esto es, cualquier compuesto que sea capaz de bloquear, inhibir, reducir o, de otra manera, interrumpir la interacción entre la histamina y su receptor) incluyendo, pero no limitando a: astemizol, acrivastina, antazolina, azatadina, azelastina, astamizol, bromofeniramina, maleato

de bromofeniramina, carbinoxamina, carebastina, cetirizina, clorfeniramina, maleato de clorfeniramina, cimetidina, clemastina, ciclizina, ciproheptadina, descarboetoxiloratadina, dexclorfeniramina, dimetindeno, difenhidramina, difenilpiralina, succinato de doxilamina, doxilamina, ebastina, efletirizina, epinastina, famotidina, fexofenadina, hidroxizina, hidroxizina, ketotifeno, levocabastina, levocetirizina, levocetirizina, loratadina, meclizina, mepiramina, mequitazina, metdilazina, mianserina, mizolastina, noberastina, norasternizol, noraztemizol, fenindamina, feniramina, picumast, prometazina, pinlamina, pirilamina, ranitidina, temelastina, terfenadina, trimeprazina, tripelenamina y triprolidina; (7) un anticolinérgico, incluyendo, pero no limitando a: atropina, benzotropina, biperiden, flutropio, hiosciamina (por ejemplo, Levsin®; Levbid®; Levsin/SL®, Anaspaz®, Levsinex timecaps®, NuLev®), ilutropio, ipratropio, bromuro de ipratropio, metescopolamina, oxibutinina, rispenzepina, escopolamina y tiotropio; (8) un antitusivo incluyendo, pero no limitando a: dextrometorfán, codeína e hidromorfona; (9) un descongestivo incluyendo, pero no limitando a: pseudoefedrina y fenilpropanolamina; (10) un expectorante incluyendo, pero no limitando a: guafenesín, guaicol sulfato, terpín, cloruro de amonio, glicerol guaicolato, y glicerol yodado; (11) un broncodilatador incluyendo, pero no limitando a: teofilina y aminofilina; (12) un antiinflamatorio incluyendo, pero no limitando a: flurbiprofeno, diclofenaco, indometacina, ketoprofeno, S-ketoprofeno, tenoxicam; (13) un inhibidor de FDE (fosfodiesterasa), incluyendo pero no limitando a, los descritos en este documento; (14) un anticuerpo no monoclonal recombinante humanizado [por ejemplo xolair (también denominado omalizumab), rhuMab y talizumab]; (15) un surfactante pulmonar humanizado incluyendo formas recombinantes de proteínas surfactantes SP-B, SP-C o SP-D [por ejemplo SURFAXIN®, anteriormente conocido como dsc-104 (Discovery Laboratories)], (16) agentes que inhiben los canales de sodio epiteliales (ENaC) tales como amilorida y compuestos relacionados; (17) agentes antimicrobianos usados para el tratamiento de infecciones pulmonares, tales como, aciclovir, amikacina, amoxicilina, doxiciclina, trimetoprima sulfametoxazol, amfotericina B, azitromicina, claritromicina, roxitromicina, claritromicina, cefalosporinas (ceffoxitina, cefmetazol etc.), ciprofloxacina, etambutol, gentamicina, ganciclovir, imipenem, isoniazid, itraconazol, penicilina, ribavirina, rifampín, rifabutín, amantadina, rimantidina, estreptomina, tobramicina y vancomicina; (18) agentes que activan la secreción de cloro a través de los canales de cloro dependientes de Ca⁺⁺ (tal como agonistas de receptores purinérgicos (agonistas de P2Y(2)); (19) agentes que disminuyen la viscosidad del esputo, tal como DNasa 1 recombinante humana, (Pulmozyme®); (20) agentes antiinflamatorios no esteroideos (acetaminofeno, acetaminofeno, ácido acetil salicílico, alclofenaco, alminoprofeno, apazona, aspirina, benoxaprofeno, bezpiperilón, ácido buclórico, carprofen, clidanac, diclofenaco, diclofenaco, diflunisal, diflunisal, etodolac, fenbufeno, fenbufeno, fenclofenac, ácido fenclórico, fenoprofeno, fentiazac, feprazona, ácido flufenámico, flufenisal, fluprofeno, flurbiprofeno, furofenac, ibufenac, ibuprofeno, indometacina, indoprofeno, isoxepac, isoxicam, ketoprofeno, ketoprofeno, ketorolac, ácido meclofenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido mefenámico, miroprofeno, mofebutazona, oxaprozín nabumetona, naproxeno, naproxeno, ácido niflúmico, oxaprozina, oxpinac, oxifenbutazona, fenacetina, fenilbutazona, fenilbutazona, piroxicam, piroxicam, pirprofeno, pranoprofeno, sudoxicam, tenoxicam, sulfasalazina, sulindac, sulindac, suprofeno, ácido tiaprofénico, tiopinac, tiopropirofeno, ácido tolfenámico, tolmetín, tolmetín, zidometacina, zomepirac y zomepirac); y (21) agentes terapéuticos antioxidantes aerosolizados tales como S-nitrosoglutatión.

1.2.2.12 Agentes antidiabéticos

Los péptidos agonistas de GCC descritos en este documento se pueden usar en combinación terapéutica con uno o más agentes antidiabéticos, incluyendo, pero no limitando a: agonistas de PPAR_γ tales como glitazonas (por ejemplo, WAY-120,744, AD 5075, balaglitazona, ciglitazona, darglitazona (CP-86325, Pfizer), englitazona (CP-68722, Pfizer), isaglitazona (MIT/J&J), MCC- 555 (Mitsubishi descrito en el documento US5594016), pioglitazona (tales como Actos™ pioglitazona; Takeda), rosiglitazona (Avandia™; Smith Kline Beecham), maleato de rosiglitazona, troglitazona (Rezulin®, descrito en el documento US4572912), rivoglitazona (CS- O11, Sankyo), GL-262570 (Glaxo Wellcome), BRL49653 (descrito en el documento WO98/05331), CLX-0921, 5-BTZD, GW-0207, LG-100641, JJT-501 (JPNT/P&U), L-895645 (Merck), R-119702 (Sankyo/Pfizer), NN-2344 (Dr. Reddy/NN), YM-440 (Yamanouchi), LY-300512, LY-519818, R483 (Roche), T131 (Tularik), y similares y compuestos descritos en los documentos US4687777, US5002953, US5741803, US5965584, US6150383, US6150384, US6166042, US6166043, US6172090, US6211205, US6271243, US6288095, US6303640, US6329404, US5994554, WO97/10813, WO97/27857, WO97/28115, WO97/28137, WO97/27847, WO00/76488, WO03/000685, WO03/027112, WO03/035602, WO03/048130, WO03/055867, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; biguanidas tales como clorhidrato de metformina (clorhidrato de diamida N,N-dimetilimidodicarbonimidica, tal como Glucophage™, Bristol-Myers Squibb); clorhidrato de metformina con gliburida, tales como Glucovance™, Bristol-Myers Squibb); buformina (N-butil-diamida imidodicarbonimidica); etoformina (1-butil-2-etilbiguanida, Schering A. G.); otras formas salinas de metformina (incluyendo cuando la sal se selecciona del grupo de, acetato, benzoato, citrato, timarato, embonato, clorfenoxiacetato, glicolato, palmoato, aspartato, metanosulfonato, maleato, paraclorfenoxiisobutirato, formiato, lactato, succinato, sulfato, tartrato, ciclohexanecarboxilato, hexanoato, octanoato, decanoato, hexadecanoato, octodecanoato, bencenosulfonato, trimetoxibenzoato, paratoluenosulfonato, adamantanocarboxilato, glucoxilato, glutarnato, pirrolidonocarboxilato, naftalenosulfonato, 1-glucosefosfato, nitrato, sulfito, ditionato y fosfato), y fenformina; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B), tales como A-401,674, KR 61639, OC-060062, OC-83839, OC-297962, MC52445, MC52453, ISIS 113715, y los descritos en los documentos WO99/585521, WO99/58518, WO99/58522, WO99/61435, WO03/032916, WO03/032982, WO03/041729, WO03/055883, WO02/26707, WO02/26743, JP2002114768, y las sales y ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; sulfonilureas tales como acetohexamida (por ejemplo, Dymelor, Eli Lilly),

carbutamida, clorpropamida (por ejemplo, Diabinese®, Pfizer), gliamilida (Pfizer), gliclazida (por ejemplo, Diamcron, Servier Canada Inc), glimepirida (por ejemplo, descrita en el documento US4379785, tales como Amaryl, Aventis), glipentida, glipizida (por ejemplo, Glucotrol o Glucotrol XL Liberación Prolongada, Pfizer), gliquidona, glisolamida, gliburida/glibenclamida (por ejemplo, Micronasa o Glinasa Prestab, Pharmacia & Upjohn and Diabeta, Aventis),
5 tolazamida (por ejemplo, Tolinasa), y tolbutamida (por ejemplo, Orinasa) y sales y ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; meglitinidas tales como repaglinida (por ejemplo, Prandin®, Novo Nordisk), KAD1229 (PF/Kissei), y nateglinida (por ejemplo, Starlix®, Novartis) y sales y ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; inhibidores de la α glucósido hidrolasa (o inhibidores de glucósidos) tales como
10 acarbosa (por ejemplo, Precose™, Bayer descrita en el documento US4904769), miglitol (tales como GLYSET™, Pharmacia & Upjohn descrito en el documento US4639436), camigliosa (metil 6-desoxi-6-[(2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxi-2-(hidroximetil)piperidino]-alfa-D-glucopiranosido, Marion Merrell Dow), voglibosa (Takeda), adiposina, emiglitato, pradimicin-Q, salbostatina, CKD-711, MDL-25,637, MDL- 73,945, y MOR 14, y los compuestos descritos en los documentos US4062950, US4174439, US4254256, US4701559, US4639436, US5192772, US4634765, US5157116, US5504078, US5091418, US5217877, US51091 y WOO 1/47528 (poliaminas); inhibidores de α
15 amilasa tales como tendamistat, trestatina y A1-3688 y los compuestos descritos en los documentos US4451455, US4623714, y US4273765; inhibidores de SGLT2 incluyendo los descritos en los documentos US6414126 y US6515117; un inhibidor de α P2 tal como se describe en el documento US6548529; secretagogos de insulina tales como linogirida, A4166, forskolina, dibutiril cAMP, isobutilmetilxantina (IBMX) y sales y ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; inhibidores de la oxidación de ácidos grasos, tales como clomoxir, y etomoxir, y sales y ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; antagonistas de A2, tales como midaglizol, isaglidol, deriglidol, idazoxán, earoxán y fluparoxán y sales y ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; insulina y compuestos relacionados (por ejemplo, miméticos de insulina) tales como biota, LP-100, novarapid, insulina detemir, insulina lispro, insulina glargina, suspensión de zinc con insulina (lenta y ultralenta), insulina Lys- Pro, GLP-1 (1-36) amida, GLP-1 (73-7) (insulinotropina, descrita en el documento US5614492), LY-315902 (Lilly), GLP-I (7-36)-NH2), AL-401 (Autoimmune), determinadas composiciones como se describe en los documentos US4579730, US4849405, US4963526, US5642868, US5763396, US5824638, US5843866, US6153632, US6191105, y WO 85/05029, e
25 insulina de primates, roedores o conejos incluyendo variantes biológicamente activas de los mismos incluyendo variantes alélicas, más preferiblemente insulina humana disponible en forma recombinante (fuentes de insulina humana incluyen formulaciones estériles y farmacéuticamente aceptables tales como las disponibles en Eli Lilly (Indianápolis, Ind. 46285) como Humulin™ (origen ADN de insulina humana), véase también THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 55.sup.th Ed. (2001) Medical Economics, Thomson Healthcare (que describe otras insulinas humanas adecuadas); no tiazolidinodionas tales como JT-501 y farglitazar (GW-2570/GI- 262579), y sales y ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; agonistas duales de PPAR α/γ tales como ARHO39242 (Astrazeneca), GW-409544 (Glaxo-Wellcome), BVT-142, CLX-0940, GW-1536, GW-1929, GW-2433, KRP-297 (Kyorin Merck; 5-
35 [(2,4-dioxotiazolidinil)metil] metoxi-N-[[4-(trifluorometil)fenil] metil]benzamida), L- 796449, LR-90, MK-0767 (Merck/Kyorin/Banyu), SB 219994, muraglitazar (BMS), tesaglitazar (Astrazeneca), reglitazar (JTT-501) y los descritos en los documentos WO99/16758, WO99/19313, WO99/20614, WO99/38850, WO00/23415, WO00/23417, WO00/23445, WO00/50414, WO01/00579, WO01/79150, WO02/062799, WO03/004458, WO03/016265, WO03/018010, WO03/033481, WO03/033450, WO03/033453, WO03/043985, WO 031053976, la Solicitud de los Estados Unidos No. 09/664,598, presentada del 18 de septiembre de 2000, Murakami et al. Diabetes 47, 1841-1847
40 (1998), y sales y ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; otros fármacos sensibilizadores de insulina; agonistas de receptores de VPAC2; moduladores de GLK tales como los descritos en el documento WO03/015774; moduladores retinoideos tales como los descritos en el documento WO03/000249; inhibidores de 35 GSK 3 β /GSK 3 tales como 4-[2-(2-bromofenil)-4-(4-fluorofenil-1H-imidazol-5-il)]piridina y los compuestos descritos en los documentos WO03/024447, WO03/037869, WO03/037877, WO03/037891, WO03/068773, EP1295884, EP1295885, y similares; inhibidores de la glucogeno fosforilasa (HGLPa) tales como CP-368,296, CP-316,819, BAYR3401, y los compuestos descritos en los documentos WO01/94300, WO02/20530, WO03/037864, y sales o ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; promotores de consumo de ATP tales como los descritos en el documento WO03/007990; inhibidores de TRB3; ligandos de receptores vaniloideos tales como los descritos en el documento WO03/049702; agentes hipoglucémicos tales como los descritos en los documentos WO03/015781 y WO03/040114; inhibidores de la glucógeno sintasa quinasa 3 tales como los descritos en el documento WO03/035663 agentes tales como los descritos en los documentos WO99/51225, US20030134890, WO01/24786, y WO03/059870; proteína 1 de unión a ADN sensible a insulina (IRDBP-1) como se describe en el documento WO03/057827, y similares; antagonistas de adenosina A2 tales como los descritos en los documentos WO03/035639, WO03/035640, y similares; agonistas de PPAR δ tales como GW 501516, GW 590735, y los compuestos descritos en los documentos JP10237049 y WO02/14291; inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (DPIV), tales como isoleucina tiazolidida, NVP-DPP728A (1-[[[2-[(5-cianopiridin-2-il)amino]etil]amino]acetil]-2-ciano-(S)-pirrolidina, descrita por Hughes et al, Biochemistry, 38(36), 11597-11603, 1999), P32/98, NVP-LAF-237, P3298, 50 TSL225 (ácido triptofil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico, descrito en Yamada et. al, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 8 (1998) 1537-1540), valina pirrolidida, inhibidores de TMC-2A/2B/2C, CD-26, FE999011, P9310/K364, VIP 0177, DPP4, DTZ 274-444, 2-cianopirrolididas y 4-cianopirrolidida como se describe en Ashworth et al, Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 6, No. 22, pp 1163-1166 y 2745-2748 (1996), y los compuestos descritos en los documentos US6395767, US6573287, US6395767 (los compuestos descritos incluyen BMS-477118, BMS 471211 y BMS 538,305), WO99/38501, WO99/46272, WO99/67279, WO99/67278, WO99/61431 WO03/004498, WO03/004496, EP1258476,
60 WO02/083128, WO02/062764, WO03/000250, WO03/002530, WO03/002531, WO03/002553, WO03/002593,

- WO03/000180, y WO03/000181; agonistas de GLP-I tales como exendina-3 y exendina-4 (incluyendo la exendina-4 sintética, un polipeptido de 39 aa, denominada Exenatide®) y los compuestos descritos en los documentos US2003087821 y NZ 504256, y sales y ésteres de los mismos farmacéuticamente aceptables; péptidos que incluyen amlintida y Symlin® (acetato de pramlintida); y activadores de glicoquinasa tales como los descritos en el documento US2002103199 (compuestos heteroaromáticos condensados) y el documento WO02/48106 (compuestos de propionamida isoindolín-1-ona-sustituidos).

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de fragmentos protegidos de cadena lateral de SP-304

Adhesión de Fmoc-AA-OH a resina 2-CITrt

- 10 Se suspendió resina 2-CITrt (10 g, sustitución = 1.0 mmol/g de resina) en 100 mL de diclorometano (DCM) durante 5 minutos, y luego se drenó. La esterificación se realizó usando 1.5 equiv. de Fmoc-aminoácido y 1.7 equiv. de diisopropiletilamina (DIEA) en 80 mL de DCM (con una cantidad mínima de dimetilformamida (DMF) para disolver completamente el aminoácido) durante 2 horas. La resina resultante se lavó con 60 mL de DCM y se selló en el extremo con 60 mL de solución de DIEA/metanol (1: 9, v/v) durante 30 minutos. La resina cargada se lavó a continuación con DCM (6 vol.), durante 2 veces, DMF (6 vol.), durante 3 veces y metil t-butil éter (MTBE) (6 vol.), durante 3 veces, y se secó a alto vacío. La sustitución de la resina protegida con Fmoc se determinó mediante el ensayo de liberación de Fmoc. Finalmente, el grupo Fmoc se desprotegió con una mezcla de piperidina al 5%, 1, 8-diazobicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU) al 1 % y N-hidroxibenzotriazol (HOBt) al 1% en DMF (10 vol.), durante 2 veces y la resina se lavó y se secó a alto vacío para proporcionar la resina final para la síntesis de péptidos.
- 15
- 20 Los resultados de los experimentos se enumeran en la tabla VIII a continuación.

Tabla VIII. Preparación de resina H-Gly-2CITrt y H-Leu-2CITrt

Resina de aminoácidos 2-CITrt	Escala de síntesis (mmol)	Sustitución de la resina cargada del ensayo de liberación de Fmoc	Rendimiento (Peso, % de rendimiento)
Resina H-Gly-2CITrt	4.16	0.57 mmol/g de resina	6g, 82%
Resina H-Leu-2CITrt	5.20	0.81 mmol/g de resina	6.4g, 100%
Resina H-Gly-2CITrt	300	0.80 mmol/g de resina	328.6g, 88%
Resina H-Leu-2CITrt	300	0.75 mmol/g de resina	338.5g, 84%

Síntesis de los fragmentos A y B protegidos de cadena lateral.

- 25 Se suspendió la resina H-Gly-2-CITrt o la resina H-Leu-2-CITrt en DMF (10 vol.), durante 20 minutos, luego se drenó. La resina resultante se lavó con DMF (10 vol.), durante 5 minutos. El ensamblaje de la cadena se realizó usando la química Fmoc estándar. En general, 1.5 equiv. de aminoácido Fmoc y 1.5 equiv. de HOBt se disolvieron en DMF (4.5 vol.), seguido de la adición de 1.5 equiv. de DIEA. A continuación, la solución resultante se enfrió por debajo de 5 °C con un baño de agua con hielo, y se activó mediante la adición de 1.5 equiv. de HBTU. Se añadió DCM (1.5 vol.) a la resina, seguido de la adición de la solución de aminoácido Fmoc activada. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y la finalización de la acilación se controló mediante la prueba de Kaiser. Si la prueba de Kaiser indicó la presencia de amina sin reaccionar después de 2 horas, se necesitó un reajuste con el mismo protocolo usando 1.0 equiv. de aminoácido Fmoc, 1.0 equiv. de HOBt y 1.0 equiv. de DIEA. El sello en el extremo se consiguió generalmente acetilando la amina sin reaccionar con una mezcla de solución de anhídrido acético/piridina/DMF. La secuencia peptídica se ensambló repitiendo el procedimiento de sellado anterior con los derivados de Fmoc-aminoácido correspondientes en la secuencia desde C a N-terminal. El acoplamiento del residuo de Fmoc-Cys(Trt)-OH o Fmoc-Cys(Acm)-OH se logró usando 2.0 equiv. de Fmoc-Cys(Trt)-OH o Fmoc-Cys(Acm)-OH, 2.0 de equiv. HOBt y 2.0 equiv. de la activación in situ de DIC en el protocolo DCM/DMF para minimizar la racemización de la cisteína.
- 30
- 35
- 40 Después de completar la etapa de síntesis, la resina peptídica se lavó a fondo con DMF (10 vol.), MTBE (10 vol.), DMF (10 vol. 3 veces) y MTBE (10 vol. 3 veces) y posteriormente se secó en un horno de vacío a un peso constante.

El péptido protegido de cadena lateral se escindió de la resina usando 1% de TFA/DCM (10 vol.), durante 3 veces, 5 minutos para cada vez y las fracciones de escisión se recogieron en piridina cada vez (proporción de volumen 1: 1 a TFA en cada fracción de escisión). La resina peptídica se lavó con DCM (7.5 vol.). Las fracciones se combinaron y se concentraron a vacío al 10% del volumen original, y la solución resultante se reconstituyó con etanol (3 vol.) y se

concentró hasta el 50% del volumen original. Finalmente, el péptido se precipitó mediante la adición de agua (1 vol.). El sólido se recogió por filtración al vacío o centrifugación y se lavó con agua dos veces. El producto se secó al vacío hasta un peso constante y se sometió a análisis por HPLC y ES-MS. Los resultados de los experimentos se presentan en la tabla IX a continuación.

5

Tabla IX. Preparación de los fragmentos A y B

Fragmento	Escala de Síntesis (mmol)	Peso de la resina peptídica final y rendimiento del aumento de peso de la resina	Rendimiento del fragmento obtenido (% de rendimiento)	Pureza (HPLC)	Masa del fragmento calculada/encontrada*
FmocAA7-14OH (1)	3.4	9.5g, 66.4%	3.337g (61.3%)	87.8%	1599.95/1598.86
BocAA1-60H (2)	5.2	11.8g, 76.3%	5.896g (76.9%)	94.6%	1474.80/1473.94
FmocAA7-14OH (1')	200	479.7g, 74.4%	213.7g (66.8%)	90.1%	1599.95/1598.81
BocAA1-60H (2')	200	544.0g, 101.3%	247.0g (83.7%)	94.2%	1474.80/1473.94

* Calculado = masa molecular promedio; Encontrado = masa monoisotópica por ES-MS

Ejemplo 2: condensación de fragmentos de SP-304 en solución

Síntesis del fragmento C: H-AA15-16OtBu (1-1)

Una solución de Fmoc-Cys(Acm)-OH (124.38 g, 0.3 mol), H-Leu-OtBu.HCl (67.12 g, 0.3 mol) y HOBt (40.54 g, 0.3 mol) en DMF (600 mL) se enfrió a -5 °C. Se añadió hexafluorofosfato de 2-[1H-benzotriazol-1-il]-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) (113.79 g, 0.3 mol) y se disolvió completamente. Se añadió DIEA (183.1 mL, 1.05 mol) gota a gota durante un período de 105 minutos a la misma temperatura con buena agitación, manteniendo el pH de la mezcla entre 6 y 7. Se continuó la agitación durante 15 minutos a 0 °C y la reacción se controló con TLC. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (EtOAc) (600 mL) y H₃PO₄ al 5% (300 mL). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (600 mL). Los extractos combinados se lavaron con H₃PO₄ al 5% (2 veces), H₂O (1 vez), NaHCO₃ saturado (3 veces), H₂O (2 veces) y salmuera (2 veces). La solución se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a vacío hasta sequedad. El producto se recristalizó en éter de petróleo/EtOAc (3: 1) y se secó: 166.75 g (rendimiento 95.0%, pureza 99.0%).

Se disolvió Fmoc-Cys(Acm)-Leu-OtBu (166.75 g, 0.277 mol) en una solución de piperidina al 10% /DCM (810 mL) con agitación. La reacción se controló con TLC. Después de que la reacción se completó en 3 horas, el solvente y los materiales volátiles se eliminaron usando un rotavapor. El material oleoso obtenido se trituró con éter de petróleo para eliminar los subproductos por decantación. El residuo, un jarabe, se recogió en EtOAc y se lavó con una solución de mezcla de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH = 6), luego con NaHCO₃ saturado, H₂O purificada y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación del solvente y los materiales volátiles produjo un producto oleoso H-Cys (Acm)-Leu-OtBu (1-1) (73.23 g, rendimiento: 73.1%, pureza: 98.0%).

Síntesis del fragmento B-C: HAA7-16OtBu (2-3)

Una solución de Fmoc-AA7-14OH (1') (198.3 g, 124.0 mmol), H-AA15-16OtBu (1-1) (52.3 g, 148.8 mmol) y Cl-HOBt (21.0 g, 124.0 mmol) en DMF (2500 mL) se enfrió a -5 °C. Se añadió HBTU (51.7 g, 136.4 mmol) y se disolvió completamente. Después se añadió DIEA (54.1 mL, 310 mmol) con agitación, manteniendo el pH de la mezcla entre 6 y 7. Se continuó la agitación durante 30 minutos a 0-5 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a 20-27 °C lentamente y la agitación continuó durante una hora y media. A continuación, la mezcla se vertió en HCl acuoso 0.5 N preenfriado (10-20 °C) acuoso (20 L). La suspensión se almacenó a 20-25 °C, durante 45 minutos. El sólido se recogió filtrando la suspensión a través de un embudo de vidrio poroso de porosidad media y posterior lavado con HCl acuoso 0.5 N (3500 mL, 2 veces), agua purificada (3500 mL), NaHCO₃ acuoso saturado. (3500 mL, 2 veces) y agua purificada (3500 mL, 2 veces) y éter dietílico (2000 mL, 2 veces). Finalmente, el péptido húmedo en bruto FmocAA7-16OtBu (2-3) se secó en un desecador a alto vacío a temperatura ambiente para la producción del producto 238.22 g (pureza, 85.27%, rendimiento 98.9%).

Síntesis del A-B-C: BocAA1-16OtBu totalmente protegido (3-3)

Una solución de HAA7-16OtBu (2-3) (183.67 g, 106.71 mmol), BocAA1-6-OH (2') (157.65 g, 106.71 mmol) y 6-Cl-HOBT (18.141 g, 106.71 mmol) en DMF (3 L) se enfriaron de -3 a 0 °C. Se añadió HBTU (44.523 g, 117.38 mmol) y se disolvió completamente. Luego se añadió DIEA (55.8 mL, 320.13 mmol) con agitación, manteniendo el pH de la mezcla en 6. Se continuó la agitación durante 20 minutos a -5 a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta 25°C lentamente y la agitación se continuó durante 2.5 horas, seguido de la adición adicional de HBTU (4.048 g, 10.671 mmol) y DIEA (2 mL). La agitación se continuó durante otras 1.5 horas. La mezcla resultante se vertió en MeOH (15 L) y el precipitado se recogió y se lavó con una mezcla de MeOH/DMF (5: 1, v/v) (2 veces, 3 L), HCl 0.1N (3 L, 2 veces), NaHCO₃ saturado (2 veces), agua purificada (3 veces), éter dietílico (2 veces) y se secó a vacío para la producción del producto BocAA1-16OtBu (3-3) (278.0 g, rendimiento 82.0%. Nota: la pureza se determinó después de la desprotección).

Síntesis del SP-304: HAA1-16OH lineal parcialmente protegido (4-4)

Una mezcla de TFA/TIS/EDT (8: 1: 1, 2400 mL) se enfrió a (0-5°C) bajo nitrógeno y se añadió Boc-AA1-16OtBu (3-3) (201 g) en porciones. La suspensión resultante se agitó a 0-10 °C, durante 30 minutos, luego la solución de reacción se dejó calentar hasta 20-25°C con un baño de agua (10 minutos) y la agitación se continuó durante 1 hora adicional y 50 minutos a la misma temperatura. La mezcla de reacción se vertió en MTBE preenfriado (10 °C) (18 L). Se desprendió algo de calor durante la adición de la solución del péptido/TFA y la temperatura interna subió a 25 °C. La suspensión resultante se almacenó luego en un baño de agua helada (5-10 °C), durante 40 min. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con MTBE (2000 mL, 4 veces), y se secó al vacío sobre P₂O₅, produciendo 148.37 g de producto de color blanco crema, HAA1-16OH (4-4) (pureza: 62.23%, ES- MS, MW: calculado = 1828.07, encontrado = 1826.67).

Ejemplo 3: ciclación oxidativa y purificación de SP-304 por resina absorbente poliestirénica

Se disolvió HAA1-16OH (4-4) (0.58 g) en 5 mL de acetonitrilo y se diluyó con 575 mL de agua purificada. La solución se ajustó a pH 8-9 con solución de amoníaco al 25% y se añadió peróxido de hidrógeno al 3% (0.58 mL), luego la mezcla de reacción se mantuvo durante una hora controlando la formación de disulfuro por HPLC. Luego se pasó nitrógeno a través de la mezcla de reacción y la solución se acidificó a pH 3-4 con ácido acético (71.8% de HPLC, recuperación 98.5% estimada a partir del área del pico). A la mezcla resultante se le añadió 1% de yodo/ACN gota a gota durante un período de 10 minutos con buena agitación hasta que persistió el color amarillo del yodo. La agitación se continuó durante 30 minutos a 17-20 °C. El yodo se inactivó mediante la adición de ácido ascórbico acuoso 0.5 M hasta que el amarillo desapareció. A continuación, el pH de la mezcla se ajustó a 6-7 con solución de amoníaco al 25% (51% de HPLC, recuperación del 50% estimado a partir del área del pico).

La resina absorbente poliestirénica (D101) se empaquetó en una columna 3 (ID) x 9 (L) DE CM y se equilibró bien con 6 volúmenes de columna (CV) de etanol, 4 CV de agua purificada, 2 CV de HCl al 5% acuoso, 4 CV de agua purificada, 2 CV de NaOH al 2% acuoso y 4 CV de agua purificada a una velocidad de flujo de 3 CV/hora. La solución del péptido oxidado se cargó luego en la columna a 2 CV/h. Después de la carga, la columna se lavó con 2 CV de agua purificada a 2 CV/h. La elución se realizó aplicando etanol al 80% acuoso a la columna a 2 CV/h. Las fracciones con absorbentes de UV a 215 nm, se recogieron y combinaron (125 mL). Las fracciones combinadas se evaporaron a continuación al vacío al 10% del volumen original y la suspensión se precipitó con 125 mL de MTBE frío (10 vol). El sólido se recogió por filtración y se secó al vacío para la producción del SP-304 en bruto (0.282 g, 55% de HPLC).

Ejemplo 4: ciclación oxidativa y purificación de SP-304 mediante RP-HPLC

El péptido en bruto (4-4), preparado como se describe en el ejemplo 2 se disolvió en ACN al 10% acuoso a una concentración aproximada de 1.25 g/L con agitación continua a través de un agitador mecánico. El pH de la solución del péptido se ajustó a 8.5-9.0 con amoníaco al 20% acuoso y la solución resultante se agitó vigorosamente abierto a la atmósfera. Se añadió peróxido de hidrógeno (3%, 0.25 equiv.) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos. El análisis de HPLC mostró el consumo completo del péptido lineal. A continuación, la solución se acidificó a pH 3-4 con AcOH al 10% acuoso. La solución resultante se diluyó a una concentración de aproximadamente 1 g/L con agua purificada. Se añadió yodo (1.3% en ACN) con agitación vigorosa durante un período de 10 minutos hasta que persistió el color amarillo del yodo. A intervalos de aproximadamente media hora, se tomaron muestras de la mezcla y se analizaron mediante RP-HPLC. El pico de péptido monociclado disminuyó gradualmente y apareció un nuevo pico (péptido dicitado). La oxidación fue completa cuando no quedaba pico de péptido monociclado. El exceso de yodo se neutralizó con una pequeña cantidad de ácido ascórbico. La solución resultante se cargó en una columna C18 RP-HPLC rellena con Kromasil 100 Å, gel de sílice de 10 µm. Después de que la solución del péptido dicitado se cargó, un volumen de 3 columna, de una solución de 90% de fase móvil A (TEA al 1.0%, H₃PO₄ al 0.5% en H₂O, pH = 7) y fase móvil B al 10% (acetonitrilo) se cargó para lavar líneas. A continuación, el gradiente se realizó desde 10% de B a 30% de B en 80 minutos. Las fracciones se recogieron a intervalos registrados cuando el pico principal comenzó a eluir. La pureza de cada fracción se controló mediante RP-HPLC analítica. Las fracciones de pureza ≤95% (que no cumplían los criterios de la mezcla principal) se combinaron

de acuerdo con lo anterior y se procesaron con el mismo sistema de solución reguladora y los parámetros de elución en gradiente indicados anteriormente. Todas las fracciones con pureza $\geq 95\%$ se mezclaron y almacenaron a 2-8 °C. La solución del péptido purificada se diluyó en una proporción de 1: 1 con agua purificada y luego se cargó en la misma columna de RP-HPLC. El intercambio contraíón se realizó mediante el lavado de la columna con 2-3 volúmenes de columna de acetato de amonio acuoso 0.5 M, seguido de elución en gradiente de 90% de C (0.2% de solución acuosa de AcOH) y 10% de fase móvil D (ACN) a 50 % de fase móvil C y 50% de fase móvil D en 50 minutos. Las fracciones se recogieron a intervalos registrados y se controlaron mediante RP-HPLC analítica. Las fracciones ($\geq 95\%$) se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido seco final, 68.0 g (96.1% de pureza).

Ejemplo 5: Desalinización y aislamiento de SP-304 después de la purificación por RP-HPLC

10 Después de que la plecanatida se purificó por RP-HPLC como se describe en el ejemplo 4, se desalinizó y se aisló. En resumen, la plecanatida purificada en solución reguladora acetato de amonio/acetónitrilo/agua se cargó en una columna empaquetada con un adsorbente polimérico (resina de adsorción macroporosa) y luego se eluyó con una mezcla de alcohol/agua. Finalmente, la solución de alcohol peptídico se concentró a presión reducida, se precipitó con un éter, por ejemplo, éter dietílico o MTBE, y se secó a vacío para dar el producto final.

15 Cribado de resina (adsorbentes poliméricos)

Pretratamiento de resina: los adsorbentes poliméricos, DA201-C (de Jiangsu Suqing, China; poliestireno reticulado; área superficial 1200-1400 m²/g; diámetro de poro promedio: 3-4 nm; volumen de poro: 1.1-1.2 ml/g; densidad aparente: 0.68-0.75 g/ml; densidad a granel: 1.03-1.1 g/ml; humedad: 50-60%; tamaño de partícula: 0.315 ~ 1.25 mm $\geq 95\%$; diámetro efectivo: 0.4 ~0.7 mm; coeficiente de uniformidad: $\leq 1.6\%$), DA201-H (de Jiangsu Suqing, China; poliestireno reticulado; área superficial ≥ 800 m²/g; diámetro de poro promedio: 6-8 nm; volumen de poro: 1.5-1.8 ml/g; densidad aparente: 0.65 -0.70 g/ml; densidad a granel: 1.02-1.07 g/ml; humedad: 55-65%; tamaño de partícula: 0.315 ~ 1.25 mm $\geq 95\%$; diámetro efectivo: 0.4 ~0.7 mm; coeficiente de uniformidad: $\leq 1.6\%$), ADS-5 (de Nankai Hecheng, China; poliestireno reticulado; superficie de 520-600 m²/g; diámetro de poro promedio: 25-30 nm; densidad aparente: 0.7-0.8 g/ml; humedad: 60-70%; tamaño de partícula: 0.315 ~ 1.25 mm $\geq 95\%$; coeficiente de uniformidad: $\leq 1.6\%$), y ADS-8 (de Nankai Hecheng, China; poliestireno reticulado; área superficial 450-500 m²/g; diámetro de poro promedio: 12-16 nm; densidad aparente: 0.65-0.75 g/ml; humedad: 60-70%; tamaño de partícula: 0.315 ~ 1.25 mm $\geq 95\%$; coeficiente de uniformidad: $\leq 1.6\%$) se suspendieron en 4-6 volúmenes de etanol durante la noche. Se decantó o aspiró el sobrenadante de la resina sedimentada. Se adicionaron 6-8 volúmenes de agua desionizada y se resuspendió la resina con una suave agitación superior. Nuevamente, Se decantó o aspiró el sobrenadante de la resina sedimentada. Se repitieron las etapas anteriores de tratamiento de agua y decantación hasta que la apariencia de finos fue mínima.

Empaquetado y regeneración de columna: se resuspendieron las resinas pretratadas anteriormente con 1-2 volúmenes de agua desionizada para formar la lechada de resina, respectivamente, usando agitación suave. Se vertió la lechada de resina lentamente por el interior de la columna para evitar que quede aire atrapado. Después de que la lechada de resina se haya transferido por completo a la columna, se enjuagó el interior de la columna con una botella de chorro que contenga agua desionizada. Se abrió la salida de la columna desde un lecho de resina sedimentado (ID = 4 cm, H = 10 cm). A continuación, los lechos de resina se lavaron sucesivamente a una velocidad de flujo de 3CV por hora por 4 CV de agua desionizada, 2CV de HCl al 5% acuoso, 4CV de agua desionizada, 2CV de NaOH al 2% y finalmente 4 CV de agua desionizada hasta que el pH del eluato era alrededor de 7.

40 Preparación de muestras de carga: se disolvieron 2000 mg de plecanatida liofilizada en una mezcla de 60 mL de ACN y 150 mL de AcOH acuoso al 0.2% (el pH del AcOH acuoso se ajustó a 4 con amoniaco acuoso al 10%). Después de la filtración con membrana de Nylon de 1.2 μ m, el filtrado se diluyó a 250 mL con AcOH acuoso al 0.2% (pH 4) y se dividió en 4 partes (62.5 mL cada una) para la carga.

45 Carga de la muestra en las columnas: se cargaron 62.5 mL de la solución del péptido anterior en las 4 columnas anteriores a una velocidad de flujo de 2CV/h, respectivamente. El eluato de carga se recogió y se analizó mediante RP-HPLC para evaluar la capacidad absorbente de cada resina. Los resultados de la capacidad absorbente de cada resina se demostraron en la tabla X a continuación.

Tabla X

Resinas	Péptido en la muestra de carga	Péptido absorbido	Proporción absorbente
DA201-C	500mg	303.5mg	60.7%
DA201-H	500mg	493.4mg	98.7%
ADS-5	500mg	450.5mg	90.1%

ADS-8	500mg	466.1mg	93.2%
-------	-------	---------	-------

Método de HPLC: equipo de HPLC: Shimadzu LC-10AD vp; columna: Kromasil, C18, 4.6x250 mm; fase móvil A: TFA al 0.1% en agua; fase móvil B: TFA al 0.1% en ACN; detector: 215 nm; temperatura de la columna: 40 °C; velocidad de flujo: 1.0mL/min; gradiente: 25% de B a 45% de B en 30 min.

- 5 Cálculo de la capacidad absorbente: la capacidad absorbente de cada resina se demostró mediante la relación absorbente del péptido cargado en cada columna, que se calculó por la cantidad del péptido absorbido en cada columna de resina dividida por la cantidad de péptido en cada muestra de carga (500 mg) La cantidad de péptido absorbido en cada columna se calculó mediante la siguiente fórmula:

- 10 **Cantidad de péptido absorbido=** Cantidad de péptido en la muestra cargada- Cantidad de péptido en el eluato cargado=500mg-62.5 mL x (1.6 mg/mL x área del pico de HPLC del eluato/ área del pico de HPLC de la solución estándar del péptido)

- 15 Lavado de la columna con agua desionizada: Las columnas cargadas anteriormente se lavaron luego con 2CV de agua desionizada a 2CV/h para eliminar las sales. Los eluatos de lavado se recogieron y analizaron mediante RP-HPLC para determinar la cantidad de péptido desorbida por agua usando el mismo procedimiento anterior. Las proporciones de péptido desorbido de cada resina se enumeraron en la tabla XI a continuación.

Tabla XI

Resinas	Péptido absorbido en la resina	Péptido desorbido	Proporción de desorción
DA201-C	303.5mg	184.5mg	60.8%
DA201-H	493.4mg	40.9mg	8.3%
ADS-5	450.5mg	41.9mg	9.3%
ADS-8	466.1 mg	40.1mg	8.6%

- 20 Desorción del péptido con 90% de etanol/agua: después de 2 CV de lavados con agua, el péptido absorbido en cada columna se eluyó a continuación con 1-2CV de etanol al 90% en agua a 2 CV/h. La elución se recogió y se analizó mediante RP-HPLC para determinar la cantidad de péptido desorbida en etanol al 90% usando el mismo procedimiento anterior. Las proporciones de péptido desorbido de cada resina se enumeraron en la tabla XII a continuación.

Tabla XII

Resinas	Péptido absorbido en la resina después de 2CV de lavados con agua	Péptido desorbido	Proporción de desorción
DA201-C	119.0mg	47.6mg (por 2CV de etanol)	40%
DA201-H	452.5mg	452.5mg (por 1.5CV de etanol)	100%
ADS-5	408.6mg	408.6mg (por 1.5 CV de etanol)	100%
ADS-8	426.0mg	426.0mg (por 1.5 CV de etanol)	100%

Aislamiento del péptido de la solución de etanol: la solución del péptido/etanol/agua recogida de cada columna se concentró a presión reducida, se precipitó con MTBE, se filtró y se secó al vacío para dar el producto final. El rendimiento global del péptido procesado por cada columna se demostró en la tabla XIII a continuación.

Tabla XIII

Resinas	Péptido en la muestra de carga	Producto final obtenido	Rendimiento total
DA201-C	500mg	52mg	10.4%
DA201-H	500mg	460mg	92.0%
ADS-5	500mg	400mg	80.0%
ADS-8	500mg	430mg	86.0%

5

Conclusión de cribado de resina: A partir de los datos anteriores (Tabla X a Tabla XIII), la resina DA201-H presentó la mejor capacidad absorbente y el mejor rendimiento de desorción (por etanol) para plecanatida entre las resinas en el experimento.

Optimización del procedimiento de desalinización y aislamiento

- 10 Selección de solventes de elución: el isopropanol y el etanol son dos solventes comúnmente usados para la elución del péptido de los absorbentes poliméricos. La tabla XIV muestra la cantidad de plecanatida que se puede disolver en solución acuosa de etanol o isopropanol dependiendo del % v/v de isopropanol (o etanol): agua.

Tabla XIV

Solvente	Solubilidad
90 % de IPA/agua	67.5 mg/ml
75 % de IPA/agua	596.1 mg/ml
50 % de IPA/agua	635.0 mg/ml
90 % de EtOH/agua	302.0 mg/ml
75 % de EtOH/agua	700.0 mg/ml

- 15 El agua en la solución del péptido/alcohol se puede eliminar mediante destilación azeotrópica. La tabla XV muestra la propiedad de los azeótropos binarios de etanol/agua e isopropanol/agua.

Tabla XV

Componente A	Componente B	Punto de ebullición A	Punto de ebullición B	Punto de ebullición azeótropo	% en peso de azeótropo A
Agua	Etanol	100 °C	78.3 °C	78.2 °C	4 %
Agua	Isopropanol	100 °C	82.3 °C	80.3 °C	12.6 %

- 20 La degradación de plecanatida tendrá lugar durante el almacenamiento prolongado de la solución del péptido/alcohol/agua y el procedimiento de concentración. La tabla XVI demuestra los datos de estabilidad de plecanatida en una solución de 75% de IPA/agua y 90% de EtOH/agua a 23 °C.

Tabla XVI

ES 2 664 873 T3

Duración	Pureza (en 90 % EtOH acuoso)*	Pureza (en 75% IPA acuoso)*
0 horas	98.5%	98.7%
2 horas	98.4%	98.7%
4 horas	N/A	98.3%
6 horas	98.1%	97.5%
8 horas	N/A	96.6%
10 horas	95.5%	N/A
24 horas	92.0%	N/A
25 horas	N/A	96.1%

* Método de HPLC: equipo de HPLC: Shimadzu LC-10AD vp; columna: Kromasil, C18, 4.6x250 mm; fase móvil A: 0.1% de TFA en agua; fase móvil B: TFA al 0.1% en ACN; detector a: 215 nm; temperatura de la columna: 40 °C; velocidad de flujo: 1.0mL/min; gradiente: 25% de B a 45% de B en 30 min.

De los datos de prueba obtenidos, la plecanatida fue bastante estable a 23 °C, en una solución de alcohol/agua en 6 horas.

- 5 Los experimentos de elución se llevaron a cabo usando mezclas de isopropanol/agua con diferente % v/v. La proporción de desorción y el contenido de agua de los eluatos peptídicos se enumeraron en la tabla XVII a continuación.

Tabla XVII

v/v % de IPA/agua	75% de IPA/agua	95% de IPA/agua	100% de IPA/agua
Contenido de agua en el péptido	65.9%	53.0%	49.8%
Proporción de desorción	100%	100%	90%

- 10 75% de isopropanol/agua como solución de elución: se disolvieron 500 mg de plecanatida (98.1% de pureza) en una mezcla de 16 mL de ACN y 49 mL de AcOH al 0.2% acuoso (el pH de la solución de AcOH al 0.2% se ajustó a 4.0 por adición de NH₄OH al 10% acuoso). Después de la filtración con una membrana de nylon de 1.2 µm, la solución del péptido se cargó en una columna empaquetada con resina DA201-H (ID = 4 cm, H = 10 cm, empaquetada y pretratada por el procedimiento mencionado anteriormente) a 2CV/h. Después de la carga, la columna se lavó con 2 CV de agua desionizada a 2CV/h. A continuación, el péptido se eluyó con 1.5 CV de 75% de IPA/agua a 2CV/h. La elución se controló mediante RP-HPLC. El eluato se recogió (124 mL, 98.3% de pureza). El análisis de Karl Fisher indicó agua (65.9% en peso). En un matraz de fondo redondo de 500 mL y 1 boca se colocaron 124 mL del eluato de péptido/IPA/agua recogido anteriormente (97.6% de pureza, se produjo una ligera degradación durante el almacenamiento a 2-8 °C, durante 2 días). El matraz se colocó luego a presión reducida (60 Pa) en un evaporador rotatorio y se sumergió parcialmente en un baño de agua a 23 °C. Se formó una suspensión blanquecina mediante arrastre de alimentación de aproximadamente 622 mL de isopropanol en 2 horas a aproximadamente 1/3 del volumen inicial de la solución (97.7% de pureza). El análisis de Karl Fisher indicó agua (0.17% en peso). Al concentrado se le añadieron 350 mL de éter dietílico enfriado previamente, el sólido se recogió por centrifugación a 3500 rpm durante 3 minutos y se secó al vacío para la producción de 333 mg de producto final (rendimiento 66.6%, pureza por HPLC 97.2%).
- 15
- 20
- 25 Isopropanol al 95% /agua como solución de elución I: se disolvieron 500 mg de plecanatida (98.1% de pureza) en una mezcla de 16 mL de ACN y 49 mL de AcOH acuoso al 0.2% (el pH de la solución de AcOH al 0.2% se ajustó a 4.0 por adición de NH₄OH al 10% acuoso). Después de la filtración con una membrana de nailon de 1.2 µm, la solución del péptido se cargó en una columna empaquetada con resina DA201-H (ID = 4 cm, H = 10 cm, pretratada mediante el procedimiento mencionado anteriormente) a 2 CV/h. Después de la carga, la columna se lavó con 2 CV de agua desionizada a 2CV/h. A continuación, el péptido se eluyó con 1.5CV de 95% de IPA/agua a 2CV/h. La elución se controló mediante RP-HPLC. El eluato se recogió (117 mL, 98.1% de pureza). El análisis de Karl Fisher
- 30

5 indicó agua (52% en peso). En un matraz de fondo redondo de 500 mL y 1 boca se colocaron 117 mL del eluato de péptido/IPA/agua recogidos anteriormente. El matraz se colocó luego a presión reducida (50 Pa) en un evaporador rotatorio y se sumergió parcialmente en un baño de agua a 23 °C. Se formó un sólido blanquecino por arrastre de alimentación de aproximadamente 470 mL de isopropanol en 130 min (97.9% de pureza). Al sólido anterior se le añadieron 50 mL de éter dietílico enfriado previamente para formar una suspensión y se evaporó a presión reducida (50 Pa) en un evaporador rotatorio a 23°C hasta sequedad. El rendimiento fue de 430 mg del producto final (86%). La pureza por HPLC fue del 97.9%.

10 Isopropanol al 95%/agua como solución de elución II: 500 mg de plecanatida (98.1% de pureza) se disolvieron en una mezcla de 16 mL de ACN y 49 mL de AcOH acuoso al 0.2% (se ajustó el pH de la solución de AcOH al 0.2% a 4,0 por adición de NH₄OH al 10% acuoso). Después de la filtración con una membrana de nylon de 1.2 µm, la solución del péptido se cargó en una columna empaquetada con resina DA201-H (ID = 4 cm, H = 10 cm, empaquetada y pretratada por el procedimiento mencionado anteriormente) a 2CV/h. Después de la carga, la columna se lavó con 2 CV de agua desionizada a 2CV/h. A continuación, el péptido se eluyó con 1.5CV de 95% de IPA/agua a 2CV/h. La elución se controló mediante RP-HPLC. El eluato se recogió (118 mL, 98.2% de pureza). El análisis de Karl Fisher indicó agua (53% en peso). En un matraz de fondo redondo de 500 mL y 1 boca se colocaron 118 mL del eluato de péptido/IPA/agua recogidos anteriormente. El matraz se colocó luego a presión reducida (50 Pa) en un evaporador rotatorio y se sumergió parcialmente en un baño de agua a 23°C. Se formó una suspensión blanquecina (~40 mL) por arrastre de alimentación aproximadamente 330 mL de isopropanol en 100 min (97.7% de pureza). A la suspensión anterior se le añadieron 400 mL de éter dietílico enfriado previamente para formar una suspensión. Después de reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, el sólido se recogió por centrifugación a 3500 rpm durante 3 minutos, y se secó al vacío para la producción de 370 mg de producto final. El rendimiento fue del 74%. La pureza por HPLC fue del 97.9%.

25 Isopropanol al 95%/agua como solución de elución III: se desalaron y precipitaron 10 g de plecanatida de una manera similar a la descrita anteriormente. Curiosamente, el rendimiento de precipitación se mejoró a 93%, que es un aumento significativo en el rendimiento. La pureza por HPLC después de la precipitación fue del 98.47%.

Ejemplo 6: Caracterización de SP-304 liofilizado y SP-304 precipitado

30 La plecanatida purificada por liofilización como se describe en el ejemplo 4 y la plecanatida purificada por precipitación como se describe en el ejemplo 5 se analizaron para determinar valores significativos de impurezas químicas tales como los niveles de acetamida, TFA, ion de amonio y acetonitrilo. Los resultados se enumeran en la tabla a continuación.

	Acetamida	TFA	Ion de amonio	Acetonitrilo
Plecanatida liofilizada	356 ppm	0.14%	1.58%	40 ppm
Plecanatida precipitada	<28 ppm (LOQ del procedimiento)	0.09%	0.23%	No detectado (20 ppm LOQ)

Como se demuestra por los resultados anteriores, el procedimiento de precipitación proporcionó niveles significativamente reducidos de impurezas de procedimiento indeseables.

35 Se midieron la plecanatida purificada por liofilización como se describe en el ejemplo 4 y la plecanatida purificada por precipitación como se describe en el ejemplo 5 para obtener sus densidades aparentes, densidades a granel, distribución de tamaño de partícula y forma.

Equipo: (1) Tap Density Tester Model TD-1020; (2) Sonic Sifter Separator Model L3P; (3) Optical Microscope LINITRON 2850.

Métodos:

40 1) Mediciones de densidad aparente y a granel: Método USP 1 modificado

a. Se usó un cilindro graduado de 100.0 mL para plecanatida liofilizada

b. Se usó un cilindro graduado de 10.0 mL para plecanatida precipitada

2) Análisis de distribución de tamaño de partícula

a. Tamices usados: 200, 140, 100, 60, 40 y 30 mallas.

b. Tamaño de la muestra: 2 g de plecanatida liofilizada y 6.4 g de plecanatida precipitada

3) Análisis con microscópico óptico: tamaño de partícula y forma

a. El polvo seco se dispersó manualmente en una placa microscópica

b. Ampliación: 100 x

5 c. Bajo condiciones de luz normales (sin filtros polarizados)

Resultados:

(1) Apariencia física: plecanatida liofilizada es un polvo ligero, esponjoso y blanco. La plecanatida precipitada es un polvo ligeramente de color blanco crema.

10 (2) Densidad aparente y a granel: la tabla XVIII proporciona datos de densidad aparente y a granel para muestras de plecanatida tanto liofilizada como precipitada:

Tabla XVIII

Muestra de plecanatida	Densidad aparente, g/mL	Densidad a granel, g/mL
Liofilizada, Lote 101221	0.0332	0.0680
Precipitada, Lote 120210	0.486	0.641

15 Como se ve a partir de los datos, la plecanatida precipitada es inesperadamente significativamente más densa que la plecanatida liofilizada. La plecanatida precipitada tiene menos tendencia a la generación de polvo durante el procesamiento, lo que ofrece las ventajas de una mayor seguridad y menores pérdidas de procesamiento.

(3) Distribución del tamaño de partícula: la tabla XIX resume el análisis de distribución de tamaño de partícula. La figura 1 presenta los datos gráficamente.

Tabla XIX

# Tamaño de malla	Tamaño de partícula (mm)	Peso retenido (g)		Porcentaje retenido	
		Liofilizada	Precipitada	Liofilizada	Precipitada
30	600	0.07	0.45	3.6%	7.1%
40	425	0.26	0.17	13.3%	2.7%
60	250	0.17	0.67	8.7%	10.5%
100	150	0.51	2.08	26.0%	32.7%
140	106	0.65	1.22	33.2%	19.2%
200	75	0.24	0.68	12.2%	10.7%
Bandeja	< 75	0.06	1.09	3.1%	17.1%
	Total	1.96	6.36	100.0%	100.0%

20 Como se demuestra por la tabla XIX y la figura 1, las distribuciones de tamaño de partícula son diferentes para ambos tipos de plecanatida. Durante el análisis, se observó que la plecanatida precipitada contenía algunas partículas más grandes, que podían romperse fácilmente. También se observó que la plecanatida liofilizada parecía ser escamosa y se pegaba en la parte superior e inferior de los tamices, mientras que no se observó adherencia para la plecanatida precipitada. Indica una mejor propiedad de procesamiento de la plecanatida precipitada.

(4) Tamaño y forma de partícula: Las figuras 2 y 3 proporcionan un análisis microscópico óptico de muestras de plecanatida liofilizada y precipitada, respectivamente. Como se ve en la figura 2, la plecanatida liofilizada está en forma amorfa y tiene formas irregulares de partículas. Forman agregados físicos con partículas que se encuentran una encima de la otra. En la figura 3, la plecanatida precipitada muestra partículas individuales distinguibles. A partir de las apariencias y formas de las partículas, la plecanatida precipitada tendrá una mejor propiedad de flujo y, por lo tanto, puede facilitar el procesamiento de sólidos durante la fabricación.

Las formas liofilizadas y precipitadas de plecanatida han mostrado apariencias físicas y propiedades distinguibles por densidad, distribución del tamaño de partícula y análisis de forma. La forma precipitada es más apropiada para el procesamiento de formas de dosificación sólidas durante la fabricación en términos de reducción de la generación de polvo, menos adherencia en el equipo de procesamiento y, potencialmente, menores pérdidas de procesamiento.

La forma precipitada es más apropiada para procesar la forma de dosificación sólida durante la fabricación (por ejemplo, una forma de dosificación sólida de baja dosis). La mayor densidad del material precipitado reducirá las pérdidas de aerosoles o "polvo" durante el pesaje, la transferencia y la mezcla. Se ha demostrado que la forma diferente de la partícula reduce la pérdida causada al adherirse a pantallas o tamices. La densidad más alta debería mejorar la uniformidad del contenido ya que el tamaño y la densidad de las partículas del fármaco coinciden más estrechamente con los de los excipientes.

Ejemplo 7: formulación de dosis baja de SP-304 precipitado

La plecanatida purificada por precipitación como se describe en el ejemplo 5 se procesa adicionalmente para preparar formulaciones de baja dosis como se describe a continuación.

composición del lote de mezcla en seco

Ítem No.	Ingrediente	Concentración % p/p
1	SP-304	0.3246
2	celulosa microcristalina (Avicel PH 102)	99.43
3	Estearato de magnesio	0.2500
4	Caparazón de cápsulas de HPMC	n/a
	Total	100

Mezcla:

Avicel PH 102 se criba a través de un tamiz de malla 60. Los mezcladores en V (1 Qt, 4Qt y 16 Qt) son luego espolvoreados por Avicel PH 102 cribado. El SP-304 se criba a través de un tamiz de malla 200 y se carga en el mezclador en V de 1 Qt. A continuación, se añaden aproximadamente 80 g de Avicel PH 102 en el mezclador de 1 Qt y la mezcla se mezcla durante 10 minutos a 25 rpm. La mezcla se transfiere luego al mezclador en V de 4 Qt que se espolvorea previamente con Avicel PH 102 cribado. El mezclador de 1 Qt se enjuaga con Avicel y el material de enjuague se transfiere al mezclador de 4 Qt. El enjuague se repite hasta que todo el SP-304 se transfiere al mezclador de 4-Qt. Se añaden aproximadamente 200 g de Avicel al mezclador en V de 4-Qt y la mezcla se mezcla durante 10 minutos. La mezcla resultante se criba a continuación a través de un tamiz de malla 60 y luego se transfiere al mezclador de 16 Qt previamente espolvoreado (espolvoreado con 1500 g de Avicel). El mezclador de 4-Qt se enjuaga con Avicel y el material de enjuague se transfiere al mezclador de 16-Qt. El Avicel restante se añade al mezclador de 16 Qt y la mezcla se mezcla durante 10 minutos. La mezcla resultante se pasa a través de Comil, se enjuaga con exceso de Avicel, y luego se devuelve al mezclador de 16 Qt y se mezcla adicionalmente durante 5 minutos. Se pesa la cantidad apropiada de estearato de magnesio, se criba a través de un tamiz de malla 60 y se añade al mezclador de 16 Qt. La mezcla resultante se mezcla durante 2 minutos. La mezcla resultante se empaqueta en cápsulas o se comprime para formar los comprimidos.

Encapsulación

Se preparó una carga de cápsula MG2 Planeta. Se determinó el peso promedio de las capas de cápsulas vacías y se calculó el peso de llenado de la cápsula objetivo ($\pm 5\%$). La mezcla del procedimiento anterior se añadió a la tolva del relleno de la cápsula y se inicia la encapsulación. Los parámetros de peso del análisis se ajustaron manualmente. Las cápsulas resultantes se clasificaron de acuerdo con el peso de relleno objetivo.

Compresión

ES 2 664 873 T3

Se establece una prensa para los comprimidos Fette. A continuación, la mezcla de mezcla se carga en la tolva de polvo y se instala la herramienta. El peso de cada comprimido se establece en $100 \text{ mg} \pm 5\%$ y la dureza en 4-6 Kp. El peso, la dureza y el grosor de los comprimidos se miden y registran cada 5 a 10 minutos. La medición de la friabilidad también se realiza para garantizar un producto satisfactorio.

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un péptido que comprende una secuencia agonista de GCC seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-44 y 99-107, en el que la secuencia agonista de GCC tiene n unidades de aminoácidos de longitud, con la unidad N-terminal en la posición 1 y la unidad C-terminal en la posición n, el procedimiento que comprende:
- 5 proporcionar un primer fragmento que tiene una primera secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición j hasta la posición k de la secuencia agonista de GCC, en el que j es un número entero entre 1 y n-1, k es un número entero entre 2 y n y es superior a j, y el primer fragmento está protegido excepto por un grupo amino de la unidad de aminoácido en la posición j, o alternativamente, un grupo carboxilo de la unidad de aminoácido en la posición k,
- 10 proporcionar un segundo fragmento que tiene una segunda secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición j-1 de la secuencia agonista de GCC o que tiene una tercera secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición k+1 hasta la posición m de la secuencia agonista de GCC, en el que h es un número entero entre 1 y n-2 y es más pequeño que j, m es un número entero entre k+2 y n, y el segundo fragmento está protegido excepto por un grupo carboxilo de la unidad de aminoácidos en la posición j-1 o un grupo amino de la
- 15 unidad de aminoácidos en la posición k+1, en el que al menos uno del primer y segundo fragmentos se proporciona a través de una síntesis de péptidos en fase sólida; y
- el acoplamiento del primer y segundo fragmentos mediante una síntesis en fase de solución para la producción de un péptido protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición k de la secuencia agonista de GCC o un péptido protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición j hasta la posición m de la secuencia agonista de GCC, y
- 20 en el que el péptido se purifica mediante un procedimiento que comprende la adsorción del péptido en una columna adsorbente polimérica, opcionalmente el enjuague del péptido con agua desionizada, la elución del péptido opcionalmente enjuagando la columna adsorbente polimérica con una solución acuosa de isopropanol para formar una solución peptídica, eliminando el agua y el isopropanol de la solución peptídica para precipitar el péptido, y
- 25 opcionalmente añadir un éter al péptido deshidratado para facilitar la precipitación del péptido.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la secuencia agonista de GCC se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 8 y 9, preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1 y 9.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que h es 7, j es 15 y k es 16.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, que comprende además la desprotección de un grupo amino de la unidad de aminoácidos en la posición 7 del péptido protegido que tiene la secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 7 hasta la posición 16 de la secuencia agonista de GCC para la producción de un péptido reactivo en la posición-7.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende además proporcionar un tercer fragmento que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición 6 de la secuencia agonista de GCC, en el que el tercer fragmento está protegido excepto por un grupo carboxilo del aminoácido en la posición 6, proporcionando preferiblemente el tercer fragmento mediante una síntesis de péptidos en fase sólida, y el acoplamiento del tercer fragmento y el péptido reactivo en la posición-7 a través de una síntesis en fase de solución para la producción de un péptido lineal protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición 16 de la secuencia agonista de GCC.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además la desprotección del péptido lineal protegido para la producción de un péptido lineal desprotegido y la oxidación del péptido lineal desprotegido para la producción del péptido que comprende la secuencia agonista de GCC seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1 y 9.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que al menos uno del primer y segundo fragmentos se proporciona a través de una síntesis de péptidos en fase sólida.
- 45 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que cada uno del primer y segundo fragmentos no tiene más de 10 unidades de aminoácidos de longitud.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el segundo fragmento tiene la segunda secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición j-1 de la secuencia agonista de GCC y ya sea una o ambas de la unidad de aminoácidos del segundo fragmento en la posición j-1 y la unidad de aminoácidos del primer fragmento en la posición k se selecciona del grupo que consiste en glicina, prolina, leucina, alanina y arginina, y preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en glicina y prolina; o el segundo fragmento tiene la tercera secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición k+1 hasta la posición m de la secuencia agonista de GCC
- 50

y ya sea una o ambas de la unidad de aminoácidos del segundo fragmento en la posición m y la unidad de aminoácidos del primer fragmento en la posición k se selecciona del grupo que consiste en glicina, prolina, leucina, alanina y arginina, y preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en glicina y prolina.

- 5 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que k es n, el segundo fragmento tiene la segunda secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición j-1 de la secuencia agonista de GCC, y la unidad de aminoácidos en las posiciones j-1 se selecciona del grupo que consiste en glicina, prolina, leucina, alanina y arginina.
- 10 11. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende además la desprotección de un grupo amino de la unidad de aminoácido en la posición h del péptido protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición h hasta la posición k de la secuencia agonista de GCC para la producción de un péptido reactivo en la posición h.
- 15 12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además proporcionar un cuarto fragmento que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición h-1 de la secuencia agonista de GCC, en el que el cuarto fragmento está protegido excepto por un grupo carboxilo de la unidad de aminoácido en la posición h-1, proporcionando preferiblemente el cuarto fragmento a través de una síntesis de péptidos en fase sólida y más preferiblemente el cuarto fragmento no tiene más de 10 unidades de aminoácidos de longitud, y acoplado el cuarto fragmento y el péptido reactivo de la posición h a través de una síntesis en fase de solución para la producción de un péptido lineal protegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición n de la secuencia agonista de GCC.
- 20 13. El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende además la desprotección del péptido lineal protegido para la producción de un péptido lineal desprotegido que tiene una secuencia de unidades de aminoácidos desde la posición 1 hasta la posición n de la secuencia agonista de GCC y la oxidación del péptido lineal desprotegido para la producción del péptido que comprende la secuencia agonista de GCC seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-44 y 99-107.

25

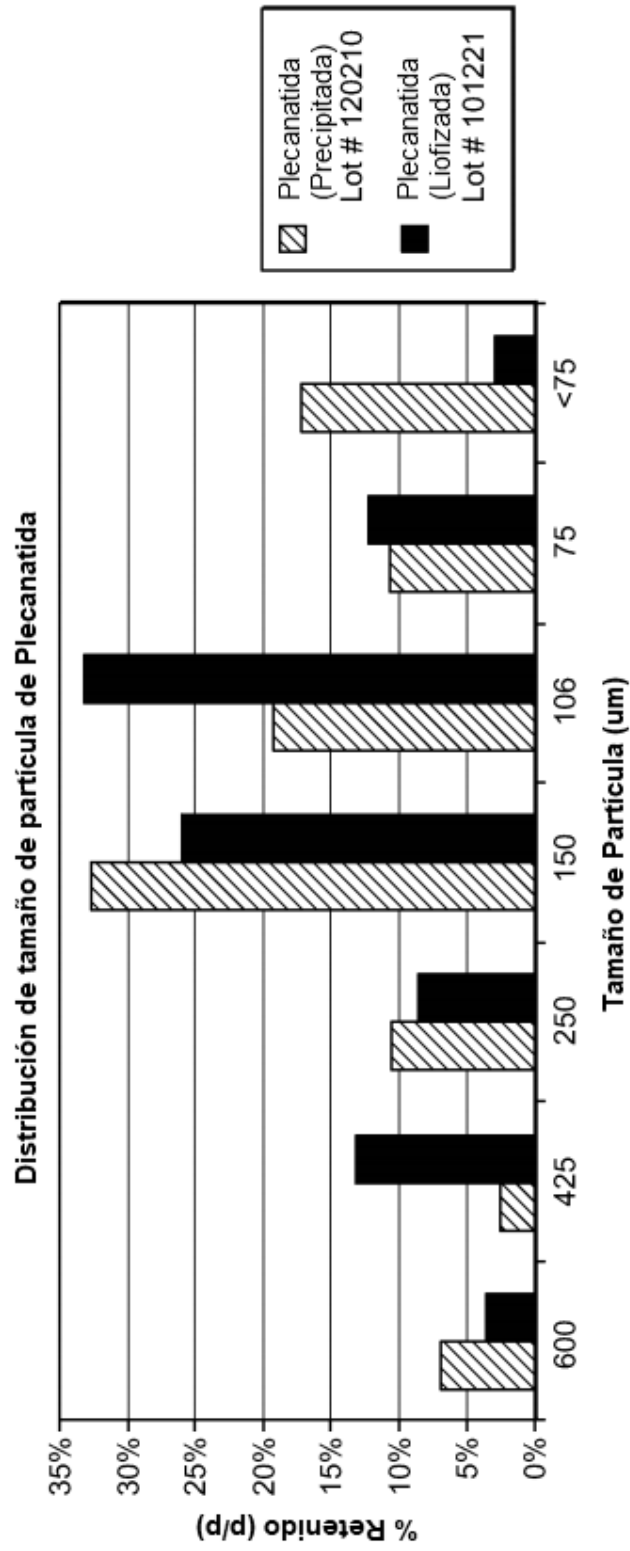


FIG. 1

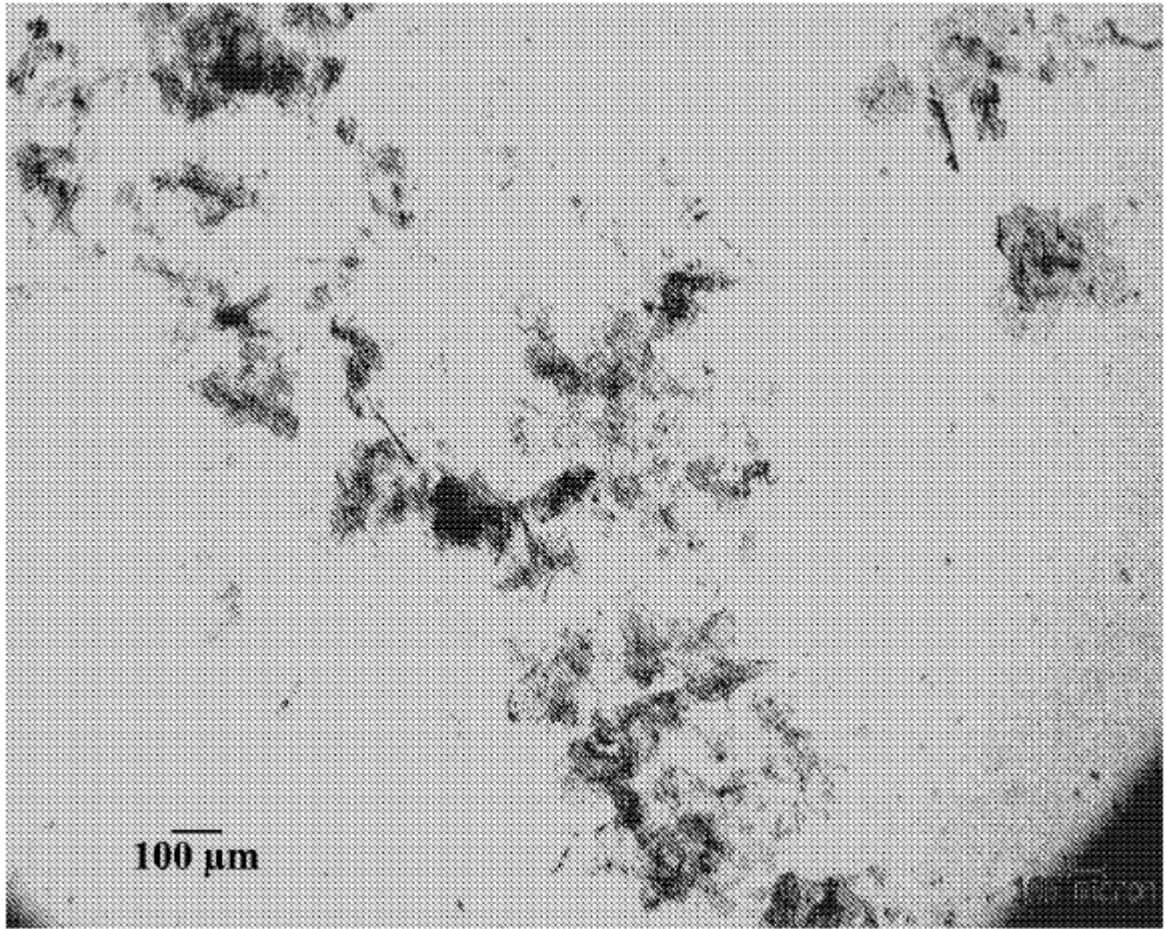


FIG. 2

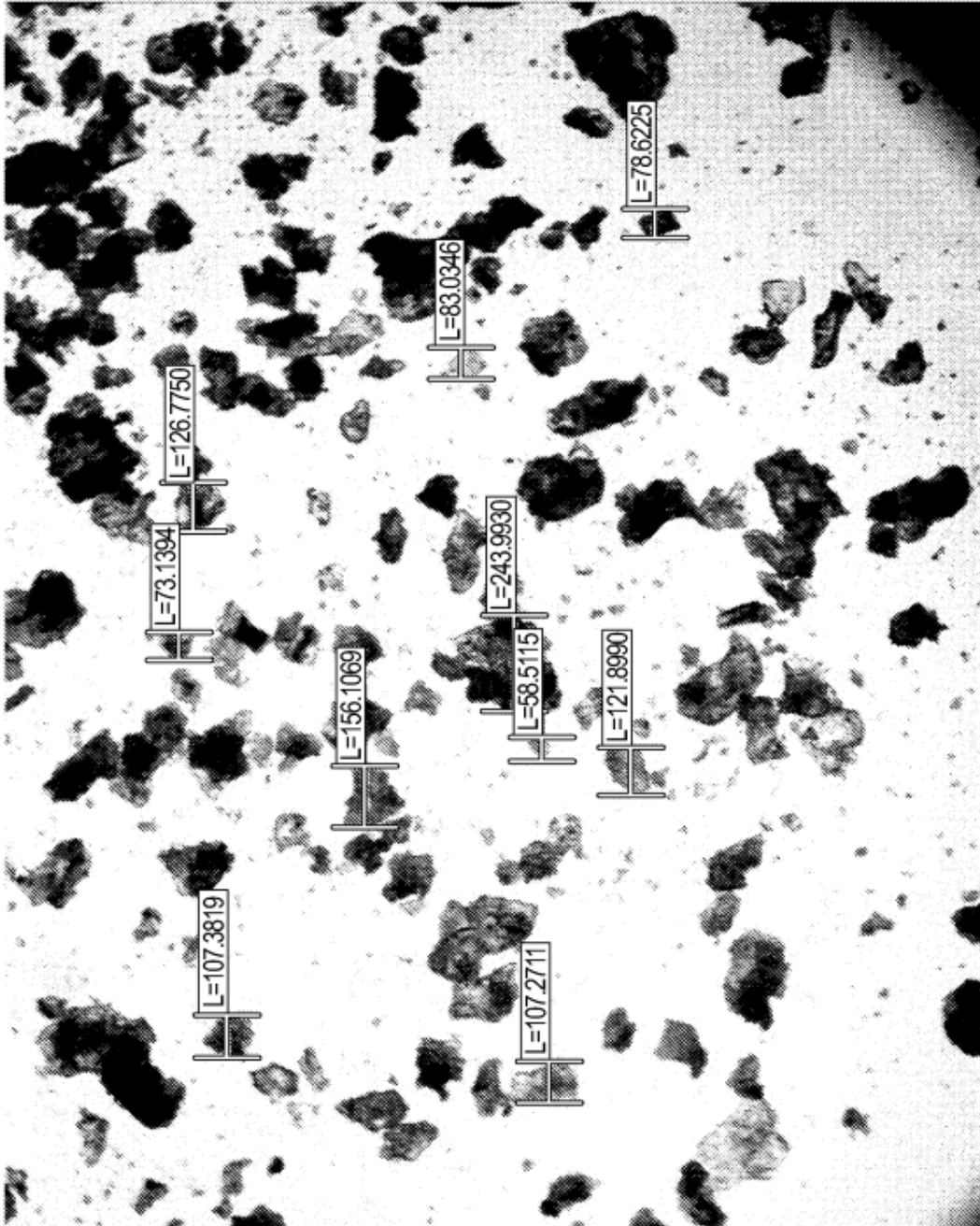


FIG. 3