

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 522 968**

(51) Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2009 E 09759438 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2328910**

---

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

(30) Prioridad:

**04.06.2008 US 58892 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.11.2014**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**SHAILUBHAI, KUNWAR y  
JACOB, GRAY, S.**

(74) Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 522 968 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).

**DESCRIPTION**

Agonistas de guanilato ciclase útiles para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, inflamación, cáncer y otros trastornos

5

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente invención se refiere a la utilización terapéutica de agonistas de la guanilato ciclase C (GC-C) como medio para incrementar la producción intracelular de GMPc. Los agonistas pueden utilizarse solos o en combinación con inhibidores de fosfodiesterasa específica de GMPc con el fin de prevenir o tratar la inflamación, el cáncer y otros trastornos, en particular del tracto gastrointestinal y los pulmones.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0002] La uroguanilina, la guanilina y los péptidos ST bacterianos son péptidos estructuralmente relacionados que se unen a un receptor de la guanilato ciclase y estimulan la producción intracelular del guanosín-monofosfato cíclico (GMPc) (1-6). Ello resulta en la activación del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (RTFQ), un canal membranal apical para la salida del cloro de los enterocitos que revisten el tracto intestinal (1-6). La activación del RTFQ y el consiguiente incremento de la secreción transepitelial de cloro conducen a la estimulación de la secreción de sodio y agua hacia la luz intestinal. Por lo tanto, al servir como reguladores paracrinos de la actividad del RTFQ, los agonistas de receptores de GMPc regulan el transporte de líquidos y electrolitos en el tracto GI (1-6, patente US nº 5.489.670). De esta manera, la activación mediada por GMPc del RTFQ y la señalización posterior desempeñan un papel importante en el funcionamiento fisiológico normal del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, cualquier anormalidad en este proceso potencialmente podría conducir a trastornos gastrointestinales, tales como el síndrome del intestino irritable, la enfermedad intestinal inflamatoria, acidez excesiva y cáncer (25, 26).

[0003] El proceso de renovación epitelial implica la proliferación, migración, diferenciación, senescencia y finalmente pérdida de células del GI en la luz (7, 8). La mucosa GI puede dividirse en tres zonas diferenciadas basándose en el índice de proliferación de las células epiteliales. Una de estas zonas, la zona proliferativa, consiste de células madre no diferenciadas que son responsables de proporcionar una fuente constante de nuevas células. Las células madre migran hacia la luz intestinal, en la que son extruidas. A medida que migran, las células pierden su capacidad de dividirse y se diferencian para llevar a cabo funciones especializadas de la mucosa GI (9). La renovación de la mucosa GI es muy rápida, con una renovación completa en un periodo de 24 a 48 horas (9). Durante este proceso, las células mutadas y no deseadas son sustituidas por nuevas células. Por lo tanto, la homeostasis de la mucosa GI está regulada por un mantenimiento continuo del equilibrio entre las tasas de proliferación y apoptosis (8).

[0004] Las tasas de proliferación y apoptosis celulares en el epitelio intestinal pueden incrementarse o reducirse en una amplia diversidad de circunstancias diferentes, por ejemplo en respuesta a estímulos fisiológicos, tales como el envejecimiento, señales inflamatorias, hormonas, péptidos, factores de crecimiento, compuestos químicos y hábitos de alimentación. Además, una tasa de proliferación incrementada con frecuencia se asocia a una reducción del tiempo de renovación y a una expansión de la zona proliferativa (10). El índice de proliferación se ha observado que es mucho más elevado en casos patológicos de colitis ulcerosa y en otros trastornos GI (11). De esta manera, la hiperplasia intestinal es el promotor principal de la inflamación y carcinogénesis gastrointestinales.

[0005] Además de un papel para la uroguanilina y la guanilina como moduladores de la secreción de líquido e iones intestinales, dichos péptidos también podrían participar en la renovación continua de la mucosa GI mediante el mantenimiento del equilibrio entre la proliferación y la apoptosis en las células que revisten la mucosa GI. Por lo tanto, cualquier alteración de este proceso de renovación, debida a una producción disminuida de uroguanilina y/o guanilina puede conducir a inflamación GI y cáncer (25, 26). Ello es consistente con datos publicados anteriormente en el documento nº WO 01/25266, que sugieren que un péptido con el dominio activo de la uroguanilina podría actuar como inhibidor del desarrollo de pólipos en el colon y podría constituir un tratamiento para el cáncer de colon. Sin embargo, algunos datos recientes también sugieren que la uroguanilina también se une a un receptor actualmente desconocido que es diferente del receptor de GC-C (3, 4). Los ratones con inactivación génica que no presentan este receptor de guanilato ciclase muestran resistencia a los péptidos ST en el intestino, pero los efectos de la uroguanilina y los péptidos ST no resultan perturbados en el riñón *in vivo* (3). Estos resultados se ven adicionalmente apoyados por el hecho de que la despolarización membranal inducida por la guanilina resulta bloqueada por la genisteína, un inhibidor de la tirosina quinasa, mientras que la hiperpolarización inducida por la uroguanilina no resulta afectada (12, 13). De esta manera, no está claro si las actividades anti-cáncer de colon y antiinflamatoria de la uroguanilina y sus análogos se encuentran mediadas por la unión a uno o a los dos receptores.

60

[0006] La enfermedad intestinal inflamatoria es un nombre general dado a un grupo de trastornos que causan la inflamación de los intestinos, caracterizada por tejido enrojecido e hinchado. La inflamación gastrointestinal (GI) puede ser una condición crónica y con frecuencia conduce a cáncer GI (14). Entre los ejemplos de dichas enfermedades

intestinales inflamatorias (EI) se incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CI). Se estima que hasta 1.000.000 de estadounidenses padecen EI, aparentemente sin discriminación de sexo. La mayoría de casos se diagnostican antes de los 30 años de edad, aunque la enfermedad puede aparecer en la sexta, séptima y posteriores décadas de la vida.

- 5 [0007] La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria grave que afecta predominantemente al ileo y al colon, aunque también puede producirse en otras secciones del tracto GI, mientras que la CI es exclusivamente una enfermedad inflamatoria del colon, el intestino grueso (15). Al contrario que la enfermedad de Crohn, en la que se encuentran afectadas todas las capas del intestino y en la que puede haber intestino sano normal entre áreas de intestino enfermo, la CI afecta únicamente al revestimiento más interno (mucosa) del colon sin interrupciones (16). Dependiendo de qué segmento del tracto GI está afectado, la enfermedad de Crohn puede denominarse ileitis, enteritis regional, colitis, etc. La enfermedad de Crohn y la CI difieren del colon espástico o del síndrome del intestino irritable, los cuales son trastornos de la motilidad del tracto GI.
- 10 [0008] Aunque no se conoce cuál es la causa exacta de las EI, se cree que la interrupción del proceso de renovación continua de la mucosa GI podría participar en la enfermedad (17, 18). El proceso de renovación del revestimiento GI es un proceso eficiente y dinámico que implica la proliferación y sustitución continua de las células dañadas no deseadas. Las tasas de proliferación de las células que revisten la mucosa GI son muy elevadas, sólo superadas por las del sistema hematopoyético. De esta manera, el equilibrio entre la proliferación y la apoptosis resulta importante para el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa GI (19, 20).
- 15 [0009] La enterocolitis necrotizante (ECN) es una condición inflamatoria devastadora del tracto gastrointestinal que afecta a 10% de los bebés prematuros de peso inferior a 1.500 gramos. A pesar de los modernos avances médicos, sigue sin conocerse cuál es su etiología, y la morbilidad y mortalidad siguen siendo inaceptablemente elevadas, con proporciones de hasta 10% a 30% de muerte por la enfermedad entre los bebés afectados. Aunque la fisiopatología no se entiende por completo, es conocido que la prematuridad, la alimentación con fórmulas infantiles, la isquemia intestinal y la colonización bacteriana son factores de riesgo importantes. Se ha sugerido que estos factores de riesgo inician la activación de la respuesta proinflamatoria que finalmente conduce a la necrosis intestinal, y en algunos casos síndrome de disfunción multiorgánica y la muerte. Se han identificado múltiples mediadores inflamatorios que podrían contribuir a esta ruta común final. Se han estudiado en detalle varias moléculas pro- y anti-inflamatorias en modelos animales, en seres humanos e *in vitro*, incluyendo IL-6, IL-8 e IL-10, así como el óxido nítrico, los radicales libres de oxígeno y numerosos otros. Anteriormente los presentes inventores han informado de que SP-304 mejora la inflamación GI en modelos experimentales de colitis murina, posiblemente mediante la regulación negativa de citoquinas proinflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-17, IL-23 y TNF- $\alpha$  (Shailubhai *et al.*, 2007 y 2008). Por lo tanto, podrían utilizarse agonistas de GC-C, tales como la uroguanilina, la guanilina, los péptidos ST de enterotoxina de *E. coli* y sus análogos, para prevenir, controlar y tratar la ECN. Los agonistas de GC-C pueden administrarse en agua de boca o en leche materia para tratar la ECN en bebés recién nacidos.
- 20 [0010] La homeostasis GI depende tanto de la proliferación como de la muerte celular programada (apoptosis) de las células epiteliales que revisten la mucosa intestinal. Por lo tanto, se pierden continuamente células de las vellosidades a la luz del intestino y son sustituidas a una tasa sustancialmente igual por la proliferación de células en las criptas, seguido de su movimiento hacia el exterior hacia las vellosidades. Resulta cada vez más evidente que el control de la muerte celular es un regulador igualmente importante, o quizás más importante, del número de células y el índice proliferación (19, 20). Las tasas disminuidas de apoptosis con frecuencia se asocian a un crecimiento anormal, inflamación y transformación neoplásica. De esta manera, una menor proliferación y/o una muerte celular incrementada pueden reducir el número de células, mientras que una proliferación incrementada y/o una muerte celular reducida podrían incrementar el índice de proliferación del tejido intestinal (20), lo que podría conducir a enfermedades inflamatorias GI y cáncer.
- 25 [0011] Los péptidos uroguanilina y guanilina aparentemente también estimulan la apoptosis mediante el control del flujo iónico celular. Las alteraciones de la apoptosis se han asociado a la progresión tumoral al fenotipo metastásico. Aunque el cáncer gastrointestinal (GI) primario se encuentra limitado al intestino delgado, colon y recto, puede metastatizarse y extenderse a localizaciones tales como el hueso, los nódulos linfáticos, el hígado, los pulmones, el peritoneo, los ovarios y el cerebro. Al incrementar la salida de K<sup>+</sup> y la entrada de Ca<sup>++</sup>, la uroguanilina y péptidos relacionados podrían inducir la muerte de las células transformadas y, de esta manera, inhibir la metástasis.
- 30 [0012] El síndrome del intestino irritable (SII) y el estreñimiento idiopático crónico son condiciones patológicas que pueden provocar grandes molestias intestinales y malestar, aunque al contrario que las enfermedades de SII, tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, el SII no causa inflamación grave ni cambios en el tejido intestinal y no se cree que incremente el riesgo de cáncer colorrectal. En el pasado, la enfermedad intestinal inflamatoria (EI), la enfermedad celíaca y el síndrome del intestino irritable (SII) se consideraban trastornos completamente separados. Actualmente, con la descripción de la inflamación, si bien es de grado bajo, en el SII, y del solapamiento de síntomas entre el SII y la enfermedad celíaca, se está cuestionando esta afirmación. La gastroenteritis bacteriana aguda es el

factor de riesgo más fuerte identificado hasta el momento de posterior desarrollo de síndrome del intestino irritable postinfeccioso. Entre los factores de riesgo clínico se incluyen la enfermedad aguda prolongada y la ausencia de vómitos. Una susceptibilidad genéticamente determinada a los estímulos inflamatorios también podría ser un factor de riesgo de síndrome del intestino irritable. La fisiopatología subyacente indica una permeabilidad intestinal

5 incrementada e inflamación de grado bajo, así como una motilidad alterada y sensibilidad visceral (27). La serotonina (5-hidroxíptamina [5-HT]) es un modulador clave de la función intestinal y es conocido que desempeña un papel importante en la fisiopatología del SII. Se ha demostrado que la actividad de 5-HT se encuentra regulada por el GMPC (28). Por lo tanto, basándose en esta observación, así como en otros efectos del GMPC, los presentes inventores creen que los agonistas de GC-C resultarán útiles en el tratamiento del SII.

10 [0013] Dada la prevalencia de condiciones inflamatorias en las sociedades occidentales y el consiguiente riesgo de desarrollar lesiones cancerosas a partir del tejido inflamado, particularmente tejido intestinal, existe una necesidad de mejorar las opciones de tratamiento para las condiciones inflamatorias, en particular del tracto gastrointestinal.

## 15 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0014] La presente invención se basa en el desarrollo de agonistas de receptores de la guanilato ciclase. Los agonistas son análogos de la uroguanilina y péptidos ST bacterianos y presentan propiedades superiores, tales como, por ejemplo, una resistencia elevada frente a la degradación en los extremos N-terminal y C-terminal por las carboxipeptidasas y/o por otros enzimas proteolíticos presentes en los jugos intestinales humanos estimulados y en los jugos gástricos humanos.

[0015] En un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 a 4 para la utilización en el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa. La invención proporciona además 25 composiciones terapéuticas en dosis unitaria que contienen dichos péptidos en una cantidad terapéuticamente eficaz y un portador, excipiente o diluyente farmacéutico para la utilización en el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa. La expresión "que consiste esencialmente de" incluye péptidos que son idénticos a un número de identificación de secuencia indicado y otras secuencias que no difieren sustancialmente en términos de estructura o función. Para el propósito de la presente solicitud, un péptido difiere sustancialmente en el caso de que su estructura 30 varíe en más de tres aminoácidos respecto a un péptido de SEC ID nº 2 a 4 ó en el caso de que su activación de la producción celular de GMPC se reduzca en más de 50% en comparación con un péptido de control tal como SEC ID nº 1. Preferentemente, los péptidos sustancialmente similares deberían diferir en no más de dos aminoácidos y no diferir en más de aproximadamente 25% respecto a la producción de GMPC activador. Las secuencias peptídicas de la invención comprenden por lo menos 12 residuos aminoácidos, preferentemente de una longitud de entre 12 y 26 35 aminoácidos.

[0016] Los péptidos pueden encontrarse presentes en una composición farmacéutica en forma de dosis unitaria, conjuntamente con uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La expresión "forma de dosis unitaria" se refiere a una entidad de administración de fármaco única, por ejemplo una tableta, cápsula, 40 solución o formulación para inhalación. La cantidad de péptido presente debería ser suficiente para presentar un efecto terapéutico positivo al administrarla en un paciente (típicamente entre 100 µg y 3 g). Lo que constituye un "efecto terapéutico positivo" dependerá de la condición particular bajo tratamiento e incluirá cualquier mejora significativa de la condición fácilmente identificada por el experto en la materia. Por ejemplo, puede constituir una reducción de la inflamación, el encogimiento de polípos o tumores, una reducción de las lesiones metastásicas, etc.

45 [0017] En todavía otro aspecto una invención proporciona la administración en dicho paciente de una dosis eficaz de un inhibidor de fosfodiesterasa específica de GMPC (GMPC-PDE), concurrente o secuencialmente con dicho agonista de receptor de guanilato ciclase. Entre los inhibidores de GMPC-PDE se incluyen, por ejemplo, suldinac sulfona, zaprinast y motapizona, vardenfilo y sildenafil. Los péptidos agonistas de GC-C pueden utilizarse en combinación 50 con inhibidores de transportadores de nucleótidos cíclicos.

[0018] Opcionalmente también se administran agentes antiinflamatorios. Entre los agentes antiinflamatorios se incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (NSAID).

55 [0019] Otras características y ventajas de la invención se encontrarán comprendidas y resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y reivindicaciones siguientes.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

60 [0020] La presente invención se basa en el desarrollo de agonistas de la guanilato ciclase C (GC-C). Los agonistas son análogos de la uroguanilina y presentan propiedades superiores, tal como, por ejemplo, una elevada resistencia a la degradación en los extremos N-terminal y C-terminal por carboxipeptidasas y/o por otros enzimas proteolíticos, tales como los presentes en el líquido intestinal humano simulado (LIS) y líquido gástrico humano simulado (LGS).

Concretamente, dichos péptidos contienen polietilenglicol o un polímero del mismo en el extremo amino, en el extremo carboxilo o en ambos. De esta manera, el péptido se encuentra protegido de la degradación por proteasas presentes en el LIS y en el LGS. El péptido consiste esencialmente de SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 ó SEC ID nº 4 mostrados en la Tabla 1.

[0021] La GC-C se expresa en diversas células, incluyendo las células epiteliales gastrointestinales, y sobre tejidos extraintestinales, incluyendo los tejidos renales, pulmonares, pancreáticos, pituitarios, adrenales, del hígado en desarrollo, cardíacos y reproductores masculino y femenino (revisados en Vaandrager, Mol. Cell. Biochem. 230:73-83, 2002). La GC-C es un regulador clave del equilibrio de líquidos y electrolitos en el intestino y el riñón. En el intestino, al estimularla, la GC-C causa un incremento del GMPc epitelial intestinal. Este incremento del GMPc causa una reducción de la absorción de agua y electrolitos y una mayor motilidad intestinal.

[0022] Los agonistas de la guanilato ciclase C para la utilización según la invención son péptidos que consisten esencialmente de SEC ID nº 2 a 4 y se resumen a continuación, en la Tabla I. Los agonistas de la guanilato ciclase C para la utilización según la invención se denominan colectivamente en la presente memoria "péptidos GCRA".

Tabla I Péptidos GCRA

Nombre	Estructura	SEC ID nº
SP304	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	1
SP-304 di-PEG	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup> PEG3	2
SP-304 N-PEG	PEG3-Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup>	3
SP-304 C-PEG	Asn <sup>1</sup> -Asp <sup>2</sup> -Glu <sup>3</sup> -Cys <sup>4</sup> -Glu <sup>5</sup> -Leu <sup>6</sup> -Cys <sup>7</sup> -Val <sup>8</sup> -Asn <sup>9</sup> -Val <sup>10</sup> -Ala <sup>11</sup> -Cys <sup>12</sup> -Thr <sup>13</sup> -Gly <sup>14</sup> -Cys <sup>15</sup> -Leu <sup>16</sup> -PEG3	4

[0023] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria se unen a la guanilato ciclase C (GC-C) y estimulan la producción intracelular del guanosín-monofosfato cíclico (GMPc). Opcionalmente, los péptidos GCRA inducen la apoptosis. En algunos aspectos, los péptidos GCRA estimulan la producción de GMPc intracelular a niveles más altos que los agonistas de GC-C naturales (por ejemplo la uroguanilina, la guanilina y los péptidos ST) y/o SP-304. Por ejemplo, los péptidos GCRA de la invención estimulan 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o más GMPc intracelular que los agonistas de GC-C naturales y/o SP-304. Los términos inducción y estimulación se utilizan intercambiablemente en toda la memoria. Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria son más estable que los agonistas de GC-C naturales y/o SP-304. Más estable se refiere a que el péptido se degrada menos y/o más lentamente en líquido gastrointestinal simulado y/o líquido intestinal simulado en comparación con los agonistas de GC-C naturales y/o SP-304. Por ejemplo, el péptido GCRA de la invención degrada 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o menos que los agonistas de GC-C naturales y/o SP-304.

[0024] La invención proporciona los péptidos GCRA descritos en la presente memoria para la utilización en el tratamiento o prevención de la inflamación del sistema gastrointestinal en la forma de colitis ulcerosa.

[0025] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "guanilato ciclase C (GC-C)" se refiere a la clase de los receptores de la guanilato ciclase C en cualquier tipo celular a la que se unen los péptidos agonistas de la invención o los agonistas naturales descritos en la presente memoria. Tal como se utiliza en la presente memoria, el "receptor de guanilato ciclase intestinal" se encuentra exclusivamente sobre las células epiteliales que revisten la mucosa GI. La uroguanilina, guanilina y péptidos ST se espera que se unan a dichos receptores y podrían inducir la apoptosis. No se excluye la posibilidad de que existan diferentes receptores para cada péptido agonista. Por lo tanto, el término se refiere a la clase de los receptores de guanilato ciclase sobre las células epiteliales que revisten la mucosa GI.

[0026] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agonista de GCR" pretende referirse a péptidos y/o otros compuestos que se unen a una guanilato ciclase C intestinal y estimulan el transporte de líquidos y electrolitos. Esta expresión cubre además los fragmentos y propéptidos que se unen a GC-C y estimulan la secreción de líquidos y agua.

[0027] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sustancialmente equivalente" pretende referirse a un péptido que presenta una secuencia de aminoácidos equivalente a la del dominio de unión en la que pueden delecionarse o sustituirse determinados residuos por otros aminoácidos sin alterar la capacidad del péptido de unirse a un receptor de guanilato ciclase intestinal y estimular el transporte de líquidos y electrolitos.

[0028] La adición de portadores (por ejemplo solución salina tamponada con fosfato, o PBS) y otros componentes a la composición de la presente invención se encuentra perfectamente comprendida dentro de los conocimientos del experto en la materia. Además del compuesto, dichas composiciones pueden contener portadores farmacéuticamente

aceptables y otros ingredientes que es conocido que facilitan la administración y/o incrementan la incorporación. Otras formulaciones, tales como microesferas, nanopartículas, liposomas y sistemas de base inmunológica también pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención. Entre otros ejemplos se incluyen formulaciones con polímeros (por ejemplo polietilenglicol al 20% p/p) o celulosa, o formulaciones entéricas.

- 5 [0029] La presente invención se basa en varios conceptos que se incluyen en la presente memoria como antecedentes útiles para comprender la invención. El primero es que existe un mecanismo dependiente de GMPc que regula el equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis y que una reducción de los niveles de GMPc, debido a una deficiencia de la uroguanilina/guanilina y/o debido a la activación de fosfodiesterasas específicas de GMPc, es una etapa temprana y crucial en la transformación neoplásica. Un segundo concepto es que la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos membranales, que conduce a la activación de la fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2), la ciclooxygenasa-2 (COX-2) y posiblemente la 5-lipooxigenasa (5-LO) durante el proceso de inflamación se encuentra regulada negativamente por un mecanismo dependiente del GMPc, conduciendo a niveles reducidos de prostaglandinas y leucotrienos, y que el incremento de los niveles intracelulares de GMPc puede, por lo tanto, producir una respuesta antiinflamatoria. Además, se cree que un mecanismo dependiente de GMPc participa en el control de los procesos proinflamatorios. Por lo tanto, la elevación de los niveles intracelulares de GMPc puede utilizarse como medio para tratar y controlar los trastornos gastrointestinales, los trastornos inflamatorios, los trastornos pulmonares, el cáncer, los trastornos cardíacos, los trastornos oculares, trastornos orales, trastornos sanguíneos, trastornos hepáticos, trastornos de la piel, trastornos prostáticos, trastornos endocrinos, incrementando la motilidad gastrointestinal y la obesidad. Entre los trastornos gastrointestinales se incluyen, por ejemplo, el síndrome del intestino irritable (enterocolitis necrotizante (ECN)), dispepsia no ulcerosa, pseudoobstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudoobstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), íleo (por ejemplo el íleo postoperatorio), gastroparesis, acidez (elevada acidez en el tracto GI), estreñimiento (por ejemplo estreñimiento asociado a la utilización de medicaciones tales como los opioides, los fármacos para la osteoartritis, los fármacos para la osteoporosis; estreñimiento postquirúrgico, estreñimiento asociado a trastornos neuropáticos; entre los trastornos inflamatorios se incluyen la inflamación de tejidos y órganos, tal como la inflamación renal (por ejemplo la nefritis), la inflamación del sistema gastrointestinal (por ejemplo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa), la inflamación pancreática (por ejemplo la pancreatitis), la inflamación pulmonar (por ejemplo la bronquitis o el asma) o la inflamación de la piel (por ejemplo la soriasis, el eccema); entre los trastornos pulmonares se incluyen, por ejemplo, la EPOC y la fibrosis. El cáncer incluye la carcinogénesis en tejidos y órganos, incluyendo metástasis tales como, por ejemplo, el cáncer gastrointestinal (por ejemplo el cáncer gástrico, el cáncer esofágico, el cáncer pancreático, el cáncer colorrectal, el cáncer intestinal, el cáncer anal, el cáncer hepático, el cáncer de la vesícula biliar o el cáncer de colon; cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de piel (por ejemplo el melanoma), cáncer oral, cáncer del tracto urinario (por ejemplo cáncer de vejiga o cáncer de riñón), cáncer hematológico (por ejemplo el mieloma o la leucemia) o cáncer de próstata. Entre los trastornos cardíacos se incluyen, por ejemplo, la insuficiencia cardiaca congestiva, la hipertensión tráquea cardia, el nivel elevado de colesterol o el nivel elevado de triglicéridos. Entre los trastornos hepáticos se incluyen, por ejemplo, la cirrosis y la fibrosis. Entre los trastornos oculares se incluyen, por ejemplo, la presión intraocular incrementada, glaucoma, la degeneración retiniana por ojo seco, los trastornos de las glándulas lacrimales o la inflamación ocular. Entre los trastornos de la piel se incluyen, por ejemplo, la xerosis. Entre los trastornos orales se incluyen, por ejemplo, boca seca (xerostomía), el síndrome de Sjögren, las enfermedades de las encías (por ejemplo la enfermedad periodontal) o el bloqueo o disfunción de los conductos de las glándulas salivales. Entre los trastornos prostáticos se incluyen, por ejemplo, la hiperplasia prostática benigna (HPB). Entre los trastornos endocrinos se incluyen, por ejemplo, la diabetes mellitus, el hipertiroidismo, el hipotiroidismo y la fibrosis quística.
- 45 [0030] Sin pretender restringirse a ninguna teoría en particular, se contempla que el transporte iónica a través de la membrana plasmática demuestre ser un regulador importante del equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis que resultará afectado por los agentes que alteran las concentraciones del GMPc. Se ha demostrado que la uroguanilina estimula el flujo de salida de K<sup>+</sup>, el flujo de entrada de Ca<sup>++</sup> y el transporte del agua en el tracto gastrointestinal (3). Además, el péptido natriurético auricular (PNA), un péptido que se une además a un receptor de guanilato ciclase específico, también se ha demostrado que induce apoptosis en células mesangiales de rata, y que induce la apoptosis en miocitos cardíacos mediante un mecanismo de GMPc (21-24).

- 55 [0031] La unión de los presentes agonistas a un receptor de guanilato ciclase estimula la producción de GMPc. Esta interacción de ligando-receptor, mediante la activación de una cascada de proteína quinasas dependientes de GMPc y CFTR, induce la apoptosis en las células diana. Por lo tanto, la presente invención proporciona nuevos péptidos, que consisten esencialmente de SEC ID nº 2 a 4, tal como se muestra en la Tabla I, para la utilización en el tratamiento y prevención de la colitis ulcerosa. Se da a conocer la utilidad en la eliminación o, por lo menos en el retardo, de la aparición de los trastornos adicionales siguientes: trastornos gastrointestinales, trastornos inflamatorios, trastornos pulmonares, cáncer, trastornos cardíacos, trastornos oculares, trastornos orales, trastornos hematológicos, trastornos hepáticos, trastornos de la piel, trastornos prostáticos, trastornos endocrinos, incrementando la motilidad gastrointestinal y la obesidad. Entre los trastornos gastrointestinales se incluyen, por ejemplo, el síndrome del intestino irritable (SII), la enterocolitis necrotizante (ECN), la dispepsia no ulcerosa, la pseudoobstrucción intestinal crónica, la dispepsia funcional, la pseudoobstrucción colónica, el reflujo duodenogástrico, la enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE),

la inflamación del íleo (por ejemplo el íleo postoperatorio), la gastroparesis, la acidez (acidez elevada en el tracto GI), el estreñimiento (por ejemplo el estreñimiento asociado a la utilización de medicaciones tales como opioides, fármacos para la osteoartritis, fármacos para la osteoporosis; estreñimiento postquirúrgico, estreñimiento asociado a trastornos neuropáticos. Entre los trastornos inflamatorios se incluyen la inflamación de tejidos y órganos, tal como la inflamación renal (por ejemplo la nefritis), la inflamación del sistema gastrointestinal (por ejemplo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa), la inflamación pancreática (por ejemplo la pancreatitis), la inflamación pulmonar (por ejemplo la bronquitis o el asma) o la inflamación de la piel (por ejemplo la soriasis y el eccema). Entre los trastornos pulmonares se incluyen, por ejemplo, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis. El cáncer incluye la carcinogénesis de tejidos y órganos, incluyendo metástasis tales como, por ejemplo, el cáncer gastrointestinal (por ejemplo cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer intestinal, cáncer anal, cáncer hepático, cáncer de la vesícula biliar o cáncer de colon; cáncer de pulmón; cáncer de tiroides; cáncer de piel (por ejemplo el melanoma); cáncer oral; cáncer del tracto urinario (por ejemplo el cáncer de vejiga o el cáncer renal); cáncer hematológico (por ejemplo el mieloma o la leucemia) o el cáncer de próstata. Entre los trastornos cardíacos se incluyen, por ejemplo, la insuficiencia cardíaca congestiva, la hipertensión traquea cardia, el nivel elevado de colesterol o el nivel elevado de triglicéridos. Entre los trastornos hepáticos se incluyen, por ejemplo, la cirrosis y la fibrosis. Entre los trastornos oculares se incluyen, por ejemplo, la presión intraocular incrementada, el glaucoma, la degeneración retiniana por ojo seco, los trastornos de las glándulas lacrimales o la inflamación ocular. Entre los trastornos de la piel se incluyen, por ejemplo, la xerosis. Entre los trastornos orales se incluyen, por ejemplo, boca seca (xerostomía), el síndrome de Sjögren, las enfermedades de las encías (por ejemplo la enfermedad periodontal) o el bloqueo o disfunción del conducto de las glándulas salivares. Entre los trastornos prostáticos se incluyen, por ejemplo, la hiperplasia prostática benigna (HPB). Entre los trastornos endocrinos se incluyen, por ejemplo, la diabetes mellitus, el hipertiroidismo, el hipotiroidismo y la fibrosis quística.

[0032] La uroguanilina es una hormona peptídica circulante con actividad natriurética y se ha encontrado que estimula el transporte de líquidos y electrolitos de una manera similar a otra familia de enterotoxinas termoestables (péptidos ST) secretados por las cepas patogénicas de *E. coli* y otras bacterias entéricas que activan los receptores de la guanilato ciclase y causan diarrea secretoria. Al contrario que los péptidos ST bacterianos, la unión de la uroguanilina al receptor de la guanilato ciclase 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.

### PÉPTIDOS GCRA

[0033] Los péptidos GCRA comentados en la presente memoria son análogos de la uroguanilina y el péptido ST bacteriano. No se implica ninguna longitud particular con el término "péptido". Los péptidos GCRA pueden presentar una longitud inferior o igual a 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10 ó 5 aminoácidos.

[0034] Los péptidos GCRA pueden ser polímeros de L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de ambos. Los péptidos pueden ser péptidos D retro-inverso. La expresión "isómero retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el que la dirección de la secuencia se encuentra invertida y la quiralidad de cada residuo aminoácidos se encuentra invertida. Ver, por ejemplo, Jameson *et al.*, Nature 368:744-746, 1994; Brady *et al.*, Nature 368:692-693, 1994. El resultado neto de combinar los enantiómeros D y la síntesis inversa es que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amida se encuentra intercambiada, mientras que la posición de los grupos de cadena lateral de cada carbono alfa se conserva. A menos que se indique específicamente lo contrario, se cree que cualquier secuencia dada de L-aminoácidos puede introducirse en un péptido D retro-inverso mediante la síntesis de un inverso de la secuencia para la secuencia nativa de L-aminoácidos correspondiente. Por ejemplo, un péptido GCRA incluye la secuencia SEC ID nº 2 a 24.

[0035] La inducción de la producción de GMPc se refiere a que el péptido GCRA induce la producción de GMPc intracelular. El GMPc intracelular se mide mediante métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, el péptido GCRA de la invención estimula 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o más GMPc intracelular que los agonistas de GC-C naturales. Opcionalmente, los péptidos GCRA de la invención estimulan 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o más GMPc intracelular que SP-304 (SEC ID nº 1). El péptido GCRA estimula la apoptosis, por ejemplo la muerte celular programada o activa el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (RTFQ). Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden ser más estables que los agonistas de GC-C naturales y/o SP-304 (SEC ID nº 1). Más estable se refiere que el péptido se degrada menos y/o más lentamente en líquido gástrico simulado y/o líquido intestinal simulado que los agonistas de GC-C naturales y/o SP-304. Por ejemplo, los péptidos GCRA degradan 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 90% o menos que los agonistas de GC-C naturales y/o SP-304.

[0036] Tal como se utiliza en la presente memoria, PEG3, 3 PEG, pretende referirse a polietilenglicol, tal como, incluyendo, aminoetiloxi-etiloxi-ácido acético (AeeA).

[0037] Puede sustituirse uno o más aminoácidos de los péptidos GCRA por un aminoácido no natural o un análogo de

aminoácido natural o no natural. Existen muchos aminoácidos más allá de los 20 estándares (Ala, Arg, Asn, ASp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, He, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val). Algunos son naturales, otros no (ver, por ejemplo, The Non-Protein Amino Acids, en: Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, Barrett, Chapman and Hall, 1985). Por ejemplo, un aminoácido aromático puede sustituirse por 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, 3-yodo-L-tirosina, triyodotironina, L-tiroxina, fenilglicina (Phg) o nor-tirosina (norTyr). Phg y norTyr y otros aminoácidos, incluyendo Phe y Tyr, pueden sustituirse por, por ejemplo, un halógeno, -CH<sub>3</sub>, -OH, -CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>, -C(O)H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CN, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -SH u otro grupo. Puede sustituirse cualquier aminoácido por la forma D del aminoácido.

[0038] Con respecto a los aminoácidos no naturales o los análogos de aminoácidos naturales y no naturales, son posibles varias sustituciones en el polipéptido y agonistas descritos en la presente memoria, solos o en combinación.

[0039] Por ejemplo, pueden sustituirse residuos de glutamina por gamma-hidroxi-Glu o gamma-carboxi-Glu. Los residuos de tirosina pueden sustituirse por un aminoácido alfa-sustituido, tal como L-alfa-metilfenilalanina o por análogos tales como 3-amino-Tyr, Tyr(CH<sub>3</sub>), Tyr(PO<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Tyr(SO<sub>3</sub>H), beta-ciclohexil-Ala, beta-(1-ciclopentenil)-Ala, beta-ciclopentil-Ala, beta-ciclopropil-Ala, beta-quinolil-Ala, beta-(2-tiazolil)-Ala, beta-(triazol-1-il)-Ala, beta(2-piridil)-Ala, beta-(3-piridil)-Ala, amino-Phe, fluoro-Phe, ciclohexil-Gly, tBu-Gly, beta-(3-benzotienil)-Ala, beta-(2-tienil)-Ala, 5-metil-Trp y A-metil-Trp. Los residuos de prolina pueden sustituirse por homopro(ácido L-pipecólico), hidroxi-Pro, 3,4-deshidro-Pro, 4-fluoro-Pro o alfa-metil-Pro o un análogo de aminoácido N(alfa)-C(alfa) ciclizado con la estructura: n=0, 1, 2, 3 residuos de alanina pueden sustituirse por un aminoácido alfa-sustituido o N-metilado, tal como ácido alfa-amino-isobutírico (aib), L/D-alfa-etylalanina (L/D-isovalina), L/D-metilvalina, o L/D)-alfa-metil-leucina o un aminoácido no natural, tal como beta-fluoro-Ala. La alanina también puede sustituirse con n=0, 1, 2, 3 residuos de glicina que pueden sustituirse por ácido alfa-amino-isobutírico (aib) o L/D-alfa-etylalanina (L/D-isovalina).

[0040] Entre los ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales se incluyen un análogo no natural de la tirosina, un análogo no natural de la glutamina, un análogo no natural de la fenilalanina, un análogo no natural de la serina, un análogo no natural de la treonina, un alquilo, arilo, acilo, azido, ciano, halo, hidrazina, hidrazida, hidroxilo, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, sulfonilo, seleno, éster, tioácido, borato, boronato, fosfo, fosfona, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, hidroxilamina, ceto o aminoácido amino-sustituido, o cualquier combinación de los mismos; un aminoácido con un entrecruzante fotoactivable; un aminoácido de espín marcado; un aminoácido fluorescente; un aminoácido con un nuevo grupo funcional; un aminoácido que interactúa covalente o no covalentemente con otra molécula; un aminoácido ligante de metal; un aminoácido que se encuentra imidado en un sitio que no se encuentra naturalmente amidado; un aminoácido que contiene metal; un aminoácido radioactivo; un aminoácido fotoenjaulado y/o fotoisomerizable; un aminoácido que contiene biotina o un análogo de la biotina; un aminoácido glucosilado o modificado con carbohidrato; un aminoácido que contiene ceto; aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter; un aminoácido sustituido con un átomo pesado (por ejemplo un aminoácido que contiene deuterio, tritio, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N o <sup>18</sup>O); un aminoácido químicamente cortable o fotocortable; un aminoácido con una cadena lateral alargada; un aminoácido que contiene un grupo tóxico; un aminoácido sustituido con un azúcar, por ejemplo una serina sustituida con un azúcar, o similar; un aminoácido que contiene un azúcar unido mediante carbonos; un aminoácido redox-activo; un ácido que contiene α-hidroxi; un aminoácido que contiene amino-tioácido; un aminoácido α,α-disustituido; un β-aminoácido; un aminoácido cíclico que no es 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 L-3-(2-naftil)-alanina; una 3-metil-fenilalanina; una p-acetil-L-fenilalanina; una O-4-alil-L-tirosina; una 4-propil-L-tirosina, una tri-O-acetil-GlcNAc-β-serina; una L-Dopa; una fenilalanina fluorada; una isopropil-L-fenilalanina, una p-azido-L-fenilalanina; una p-acil-L-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 o O-alilo; una dopa O-metil-L-tirosina; un aminoácido glucosilado; 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 aminobenzoilo; ácido aminobutírico (Abu); citrulina; ácido aminohexanoico; ácido aminoisobutírico (AIB); ciclohexilalanina; d-ciclohexilalanina; hidroxiprolina; nitro-arginina; nitro-fenilalanina; nitro-tirosina; norvalina; carboxilato de octahidroindol; ornitina (Orn); penicilamina (PEN); tetrahidroisoquinolina; aminoácidos protegidos con acetamidometilo y aminoácidos pegilados. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos en los documentos nº US 2003/0108885, nº US 2003/0082575, nº US 2006/0019347 (párrafos 410 a 418) y las referencias citadas en los mismos. Los polipéptidos pueden incluir modificaciones adicionales, incluyendo las descritas en el documento nº US 2006/0019347, párrafo 589. Entre los péptidos GCRA ejemplares que incluyen un aminoácido no natural se incluyen, por ejemplo, SP-368 y SP-369.

[0041] Un aminoácido puede sustituirse por un aminoácido no esencial natural, por ejemplo taurina.

[0042] Alternativamente, los péptidos GCRA son péptidos cíclicos. Los péptidos cíclicos GCRA se preparan mediante métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, la macrociclización con frecuencia se lleva a cabo formando un enlace amida entre los extremos N-terminal y C-terminal del péptido, entre una cadena lateral y el extremo N-terminal o C-terminal (por ejemplo con K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> a pH 8,5) (Samson *et al.*, Endocrinology 137:5182-5185, 1996), o entre las cadenas laterales de dos aminoácidos, tal como cisteína. Ver, por ejemplo, DeGrado, Adv. Protein Chem. 39:51-124,

1988. En diversos aspectos, los péptidos GCRA son biciclos [4,12;7,15].

[0043] En algunos péptidos GCRA, uno o ambos elementos de una o ambas parejas de residuos Cys que normalmente forman un enlace disulfuro pueden sustituirse por homocisteína, penicilamina, 3-mercaptoprolina (Kolodziej *et al.*, Int. J. Pept. Protein Res. 48:274, 1996),  $\beta,\beta$ -dimetilcisteína (Hunt *et al.*, Int. J. Pept. Protein Res. 42:249, 1993) o ácido diaminopropiónico (Smith *et al.*, J. Med. Chem. 21:117, 1978) para formar entrecruzamientos internos alternativos en las posiciones de los enlaces disulfuro normales.

[0044] Además, pueden sustituirse uno o más enlaces disulfuro por entrecruzamientos covalentes alternativos, por ejemplo un enlace amida (-CH<sub>2</sub>CH(O)NHCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>NHCH(O)CH<sub>2</sub>-), un enlace éster, un enlace tioéster, un puente lactamo, un enlace carboamilo, un enlace urea, un enlace tiourea, un enlace éster de fosfonato, un enlace alquilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), un enlace alquenilo (-CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>-), un enlace éter (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), un enlace tioéster (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), un enlace amina (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) o un enlace tioamida (-CH<sub>2</sub>CH(S)NHCH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>NHCH(S)CH<sub>2</sub>-). Por ejemplo, Ledu *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. 100:11263-78, 2003) describen métodos para preparar entrecruzamientos lactamo y amida. Entre los péptidos GCRA ejemplares que incluyen un puente lactamo se incluyen, por ejemplo, SP-370.

[0045] Los péptidos GCRA pueden presentar uno o más enlaces polipeptídicos convencionales sustituidos por un enlace alternativo. Dichas sustituciones pueden incrementar la estabilidad del polipéptido. Por ejemplo, la sustitución del enlace polipéptido entre un residuo aminoterinal respecto a un residuo aromático (por ejemplo Tyr, Phe, Trp) por un enlace alternativo puede reducir el corte por carboxipeptidasas y puede incrementar la semivida en el tracto digestivo. Entre los enlaces que pueden sustituir los enlaces polipéptidos se incluyen un enlace retro-inverso (C(O)-NH en lugar de NH-C(O); un enlace amida reducido (NH-CH<sub>2</sub>); un enlace tiometileno (S-CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>-S); un enlace oxometileno (-O-CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>-O); un enlace etileno (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); un enlace tioamida (C(S)-NH); un enlace trans-olefina (CH=CH); un enlace trans-olefina fluoro-sustituido (CF=CH); un enlace cetometileno (C(O)-CHR o CHR-C(O) en el que R es H o CH<sub>3</sub>; y un enlace fluoro-ceto-metileno (C(O)-CFR o CFR-C(O), en el que R es H o F o CH<sub>3</sub>).

[0046] Los péptidos GCRA pueden modificarse utilizando modificaciones estándares. Las modificaciones pueden producirse en el extremo amino-terminal (N-terminal), carboxi-terminal (C-terminal), internamente o en una combinación de cualesquiera de los anteriores. En un aspecto descrito en la presente memoria, puede realizarse más de un tipo de modificación del polipéptido. Entre las modificaciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, acetilación, amidación, biotinilación, cinamoilación, farnesilación, formilación, miristoilación, palmitoilación, fosforilación (Ser, Tyr o Thr), estearoilación, succinilación, sulfurilación y ciclización (mediante puentes disulfuro o ciclización de amidas) y modificación con Cys3 ó Cys5. Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria también pueden modificarse con 2,4-dinitrofenilo (DNP), DNP-lisina, modificación con 7-amino-4-metil-coumarina (AMC), fluoresceína, NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol), p-nitroanilida, rodamina B, EDANS (ácido 5-((2-aminoetil)amino)naftalén-1-sulfónico), dabcilo, dabsilo, dansilo, rojo de Texas, FMOC y Tamra (tetrametilrodamina). Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria también pueden conjugarse con, por ejemplo, polietilenglicol (PEG); grupos alquilo (por ejemplo grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> lineales o ramificados); radicales ácidos grasos; combinaciones de PEG, grupos alquilo y radicales ácido graso (ver la patente US nº 6.309.633; Soltero *et al.*, Innovations in Pharmaceutical Technology 106-110, 2001); BSA y KLH (hemocianina de lapa americana). La adición de PEG y otros polímeros que pueden utilizarse para modificar polipéptidos de la invención se describe en el documento US 2006/019347, sección IX.

[0047] También se dan a conocer péptidos que son biológica o funcionalmente equivalentes a los péptidos descritos en la presente memoria. La expresión "biológicamente equivalente" o "equivalente funcional" pretende referirse a que las composiciones de la presente invención son capaces de demostrar algunos o todos los efectos moduladores de la producción de GMPc.

[0048] Los péptidos GCRA también pueden incluir derivados de péptidos GCRA que pretenden incluir formas híbridas y modificadas de péptidos GCRA en las que determinados aminoácidos han sido delecionados o sustituidos y modificaciones en las que uno o más aminoácidos han sido cambiados por un aminoácido modificado o aminoácido no habitual y modificaciones tales como la glucosilación, con la condición de que la forma modificada conserve la actividad biológica de los péptidos GCRA. La conservación de la actividad biológica se refiere a que el péptido GCRA induce GMPc y/o la apoptosis, aunque no necesariamente a la misma potencia que un péptido GCRA natural identificado.

[0049] Las variantes preferentes son aquéllas que presentan sustituciones de aminoácidos conservadoras realizadas en uno o más residuos aminoácidos no esenciales predichos. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la que el residuo aminoácido se sustituye por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Entre estas familias se incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (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 con ramificación beta (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De esta manera, un residuo aminoácido no esencial predicho en un polipéptido GCRA se sustituye por otro 5 residuo aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de GCRA, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes cribarse con el fin de identificarse los mutantes que conservan actividad.
- 10 [0050] También se encuentra incluido en el significado de sustancialmente homólogo cualquier péptido GCRA que pueda aislarse en virtud de la reactividad cruzada con anticuerpos al péptido GCRA.

#### **PREPARACIÓN DE PÉPTIDOS GCRA**

- 15 [0051] Los péptidos GCRA pueden prepararse fácilmente utilizando técnicas modernas de clonación, o pueden sintetizarse mediante métodos de estado sólido o mediante mutagénesis sitio-dirigida. Un péptido GCRA puede incluir formas negativas dominantes de un polipéptido.
- 20 [0052] La síntesis química puede llevarse a cabo generalmente utilizando técnicas estándares de fase solución o de fase sólida de síntesis de péptidos, en las que se establece un enlace peptídico mediante la condensación directa del grupo amino de un aminoácido con el grupo carboxi del otro aminoácido con la eliminación de una molécula de agua. La síntesis de enlaces peptídicos mediante condensación directa, tal como se ha formulado anteriormente, requiere 25 la supresión del carácter reactivo del grupo amino del primero y del grupo carboxilo del segundo aminoácido. Los sustituyentes enmascaradores deben permitir su fácil eliminación, sin inducir la degradación de la lábil molécula de péptido.
- 30 [0053] En la síntesis en fase solución puede utilizarse una amplia diversidad de métodos de acoplamiento y grupos protectores (ver Gross y Meienhofer, editores, "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", vol. 1-4 (Academic Press, 1979); Bodansky y Bodansky, "The Practice of Peptide Synthesis", 2a ed. (Springer Verlag, 1994)). Además, la purificación de intermediarios y el escalado lineal resultan posibles. El experto ordinario en la materia apreciará que la síntesis en solución requiere considerar los grupos protectores de cadena principal y de cadenas laterales y el método de activación. Además, resulta necesaria una cuidadosa selección de los segmentos para minimizar la racemización durante la condensación de segmentos. Las consideraciones de solubilidad también son un factor. La síntesis peptídica de fase sólida utiliza un polímero insoluble para proporcionar soporte durante la síntesis orgánica. La cadena peptídica soportada en polímero permite la utilización de etapas simples de lavado y filtración en lugar de laboriosas purificaciones en etapas intermedias. La síntesis peptídica en fase sólida puede llevarse a cabo generalmente según el método de Merrifield *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1963, que implica ensamblar una cadena peptídica lineal sobre un soporte de resina utilizando aminoácidos protegidos. La síntesis peptídica en fase sólida típicamente utiliza la estrategia Boc o Fmoc, las cuales son bien conocidas de la técnica.
- 35 40 [0054] El experto ordinario en la materia reconocerá que, en la síntesis de fase sólida, las reacciones de desprotección y acoplamiento deben continuar hasta completarse y los grupos bloqueantes de cadena lateral deben ser estables durante toda la síntesis. Además, la síntesis en fase sólida generalmente es más adecuada en el caso de que los péptidos se sinteticen a escala pequeña.
- 45 [0055] La acetilación del extremo N-terminal puede llevarse a cabo haciendo reaccionar el péptido final con anhídrido acético antes del corte de la resina. La C-amidación se lleva a cabo utilizando una resina apropiada, tal como una resina metilbenzimidrilamina, utilizando la tecnología de Boc.
- 50 [0056] Alternativamente, los péptidos GCRA se producen mediante técnicas modernas de clonación. Por ejemplo, los péptidos GCRA se producen en bacterias, incluyendo, aunque sin limitación, *E. coli*, o en otros sistemas existentes para la producción de polipéptidos o proteínas (por ejemplo *Bacillus subtilis*, sistemas de expresión baculovíricos utilizando células Sf9 en *Drosophila*, sistemas de expresión de levadura u hongo filamentoso, sistemas de expresión de células de mamífero) o pueden sintetizarse químicamente. En el caso de que deba producirse el péptido GCRA o 55 péptido variante en bacterias, por ejemplo *E. coli*, la molécula de ácidos nucleicos codificante del polipéptido puede codificar también una secuencia líder que permite la secreción del polipéptido maduro a partir de la célula. De esta manera, la secuencia codificante del polipéptido puede incluir la pre-secuencia y la pro-secuencia de, por ejemplo, un polipéptido ST bacteriano natural. El polipéptido maduro secretado puede purificarse a partir del medio de cultivo.
- 60 [0057] La secuencia codificante de un péptido GCRA descrito en la presente memoria puede insertarse en un vector capaz de producir y mantener la molécula de ácidos nucleicos en una célula bacteriana. La molécula de ADN puede insertarse en un vector de replicación autónoma (entre los vectores adecuados se incluyen, por ejemplo, pGEM3Z y pcDNA3, y derivados de los mismos). El vector ácido nucleico puede ser un ADN bacteriano o de bacteriófago, tal

como el bacteriófago lambda o M13 y derivados de los mismos. La construcción de un vector que contiene un ácido nucleico descrito en la presente memoria puede seguirse mediante transformación de una célula huésped, tal como una bacteria. Entre los huéspedes bacterianos adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas* y *Salmonella*. El constructo genético también incluye, además de la molécula de ácidos nucleicos codificante, elementos que permiten la expresión, tal como secuencias de promotor y reguladoras. Los vectores de expresión pueden contener secuencias de control transcripcional que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias de promotor, intensificador, operador y represor.

[0058] Una diversidad de secuencias de control transcripcional son bien conocidas de la técnica. El vector de expresión puede incluir además una secuencia reguladora de la traducción (por ejemplo una secuencia 5' no traducida, una secuencia 3' no traducida, o sitio interno de entrada ribosómica). El vector puede ser capaz de replicación autónoma o puede integrarse en el ADN del huésped para garantizar la estabilidad durante la producción del polipéptido.

[0059] La secuencia codificante de proteína que incluye un péptido GCRA descrito en la presente memoria también puede fusionarse con un ácido nucleico codificante de una etiqueta de afinidad de polipéptido, por ejemplo glutatión-S-transferasa (GST), proteína E de unión a maltosa, proteína A, etiqueta FLAG, hexahistidina, etiqueta myc o la etiqueta HA del virus influenza, con el fin de facilitar la purificación. La etiqueta de afinidad o fusión informadora se une al marco de lectura del polipéptido de interés al marco de lectura del gen codificante de la etiqueta de afinidad de manera que se genera una fusión traduccional. La expresión del gen de fusión resulta en 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 codificante de un sitio de reconocimiento de proteasa se fusiona entre los marcados de lectura para la etiqueta de afinidad y el polipéptido de interés.

[0060] Los constructos genéticos y los métodos adecuados para la producción de formas inmaduras y maduras de los péptidos GCRA y variantes descritas en la presente memoria en sistemas de expresión de proteínas diferentes de las bacterias y bien conocidos por el experto en la materia también pueden utilizarse para producir polipéptidos en un sistema biológico.

[0061] Los péptidos dados a conocer en la presente memoria pueden modificarse mediante la unión de una segunda molécula que proporciona una propiedad deseada al péptido, tal como una semivida incrementada en el cuerpo, por ejemplo la pegilación. Estas modificaciones también se encuentran comprendidas dentro del alcance del término "variante" tal como se utiliza en la presente memoria.

## MÉTODOS TERAPÉUTICOS

[0062] La presente invención proporciona un péptido que consiste esencialmente de cualquiera de las SEC ID n° 2 a 4 para la utilización en el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa.

[0063] El término "tratamiento" se refiere a reducir o aliviar los síntomas en un sujeto, a prevenir los síntomas frente al empeoramiento o avance, y/o a la prevención de enfermedades en un sujeto que no presenta ninguna enfermedad. Para un sujeto dado, la mejora de un síntoma, su empeoramiento, regresión o avance pueden determinarse mediante cualquier medida objetiva o subjetiva. La eficacia del tratamiento puede medirse como una mejora de la morbilidad o la mortalidad (por ejemplo un alargamiento de la curva de supervivencia para una población seleccionada). De esta manera, el tratamiento eficaz incluiría la terapia de una enfermedad existente, el control de la enfermedad mediante en lentecimiento o la detención de su avance, la prevención de la aparición de la enfermedad, la reducción del número o gravedad de los síntomas, o una combinación de los mismos. El efecto puede demostrarse en un estudio controlado utilizando uno o más criterios estadísticamente significativos.

[0064] Inducción de GMPC intracelular mediante la exposición, por ejemplo el contacto, de un tejido (por ejemplo tejido gastrointestinal) o célula a agonistas de GCRA. Los receptores de GC-C se expresan en todo el tracto GI desde el esófago, duodeno, yeyuno, íleo, ciego y colon. Las líneas celulares de cáncer de colon humano (T81, CaCo-2 y HT-29) también expresan receptores de GC-C. Por inducción se hace referencia a un incremento de la producción de GMPC en comparación con un tejido o célula que no ha estado en contacto con un péptido GCRA o variante. Los tejidos o células entran en contacto directo con un péptido GCRA o variante. Alternativamente, el péptido GCRA o variante se administra sistémicamente. El péptido GCRA o variante se administra en una cantidad suficiente para incrementar la concentración de GMPC intracelular; la producción de GMPC se mide mediante un ensayo celular conocido de la técnica (25).

[0065] Los trastornos se tratan, se previenen o se alivian mediante la administración en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano, que lo requiere, de una dosis terapéuticamente eficaz de un péptido GCRA. Los péptidos GCRA pueden encontrarse en una composición farmacéutica en forma de dosis unitaria, conjuntamente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La expresión "forma de dosis unitaria" se refiere a una entidad de administración de un único fármaco, por ejemplo una tableta, cápsula, solución o formulación de inhalación. La

cantidad de péptido presente debería ser suficiente para presentar un efecto terapéutico positivo al administrarla en un paciente (típicamente entre 10 µg y 3 g). Lo que constituya un "efecto terapéutico positivo" dependerá de la condición particular bajo tratamiento e incluirá cualquier mejora significativa de una condición fácilmente reconocida por el experto en la materia.

- 5 [0066] Los péptidos GCRA pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes. Por ejemplo, los péptidos GCRA pueden administrarse en combinación con inhibidores de fosfodiesterasa dependiente de GMPc, tales como, por ejemplo, suldinac sulfona, zaprinast, motapizona, vardenafilo o sildenafil; otro u otros agentes quimioterapéuticos; o fármacos antiinflamatorios tales como, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios esteroideos o no esteroideos (NSAID), tales como la aspirina.
- 10 [0067] La terapia de combinación puede llevarse a cabo mediante la administración de dos o más agentes, por ejemplo un péptido GCRA descrito en la presente memoria y otro compuesto, cada uno de los cuales se formula y se administra separadamente, o mediante la administración de dos o más agentes en una única formulación. Otras combinaciones también se encuentran comprendidas en la terapia de combinación. Por ejemplo, pueden formularse dos agentes conjuntamente y administrarse conjuntamente con una formulación separada que contenga un tercer agente. Aunque los dos o más agentes en la terapia de combinación pueden administrarse simultáneamente, ello no resulta necesario. Por ejemplo, la administración de un primer agente (o combinación de agentes) puede preceder a la administración de un segundo agente (o combinación de agentes) por minutos, horas, días o semanas. De esta manera, los dos o más agentes pueden administrarse separados por minutos o por 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 ó 24 horas o por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ó 14 días o por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 semanas. En algunos casos resultan posible intervalos incluso más largos. Aunque en muchos casos resulta deseable que los dos o más agentes utilizados en una terapia de combinación se encuentren presentes en el cuerpo del paciente simultáneamente, ello no resulta necesario.
- 15 [0068] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden combinarse con inhibidores de fosfodiesterasa, por ejemplo sulfona de sulindac, zaprinast, sildenafil, vardenafilo o tadalafilo con el fin de incrementar adicionalmente los niveles de GMPc en los tejidos u órganos diana.
- 20 [0069] La terapia de combinación también puede incluir dos o más administraciones de uno o más agentes utilizados en la combinación. Por ejemplo, en el caso de que el agente X y el agente Y se utilicen en una combinación, podrían administrarse 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.
- 25 [0070] La terapia de combinación puede incluir además la administración de uno de los agonistas de GC-C con azotrioprina y/o otros agentes inmunomoduladores. Los agentes inmunomoduladores pueden incluir fármacos y biologías de molécula pequeña, tales como Remicade, Humaira, Cimzia, etc.
- 30 [0071] La terapia de combinación puede incluir además la administración de dos o más agentes por vías o localizaciones diferentes. Por ejemplo (a) un agente se administra por vía oral y otros agentes se administran por vía intravenosa, o (b) un agente se administra por vía oral y el otro se administra localmente. En cada caso, los agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente. Las dosis aproximadas para algunos de los agentes de la terapia de combinación descrita en la presente memoria se encuentran en la columna "BNF Recommended Dose" de las tablas en las páginas 11 a 17 del documento nº WO01/76632 (los datos en las tablas se atribuyen al Formulario Nacional Británico de marzo 2000) y también pueden encontrarse en otros formularios estándares y en otros directorios de prescripción de fármacos. Para algunos fármacos, la dosis prescrita habitual para una indicación variará algo entre países. Los péptidos GCRA, solos o en combinación, pueden combinarse con cualquier portador o medio farmacéuticamente aceptable. De esta manera, pueden combinarse con materiales que no producen una reacción adversa, alérgica o de otro modo no deseada al administrarse en un paciente. Entre los portadores o medios utilizados pueden incluirse solventes, dispersantes, recubrimientos, agentes estimuladores de la absorción, agentes de liberación controlada y uno o más excipientes inertes (que incluyen almidones, polioles, agentes de granulación, celulosa microcrystalina (por ejemplo Celphere, perlas Celphere beads®), diluyentes, lubricantes, ligantes, agentes de desintegración, y similares). Si se desea, las dosis en tableta de la composición dada a conocer pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas estándares.
- 35 [0072] Se formula una composición farmacéutica para la utilización según la invención para que sea compatible con la vía de administración pretendida. Entre los ejemplos de vías de administración se incluyen la parenteral, por ejemplo intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo por inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilén-diamín-tetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico

o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede estar contenida en ampollas, jeringas desechas o viales de múltiples dosis realizados en vidrio o plástico.

[0073] Entre las composiciones farmacéuticas adecuadas para la utilización inyectable se incluyen soluciones acuosas estériles (en caso de que sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, entre los portadores adecuados se incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser lo suficientemente fluida para que presente una fácil jeringabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propileneglicol y polietileneglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, resultará preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico. Puede conseguirse una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

[0074] Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo (por ejemplo un agonista de GCRA) en la cantidad necesaria en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, indicados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización mediante filtración. Generalmente, se preparan dispersiones mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que rinde unos polvos del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución filtrada a esterilidad de los mismos.

[0075] Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible, tal como manitol, fructooligosacáridos, polietileneglicol y otros excipientes. Pueden encontrarse contenidos en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de tabletas, trociscos o cápsulas. También pueden prepararse composiciones orales utilizando un portador líquido para la utilización como lavado bucal, en el que el compuesto en el portador líquido se aplica oralmente y se enjuaga en la boca y se expectora o se deglute. Pueden incluirse como parte de la composición agentes ligantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligante tal como celulosa microcrystalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un glidante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente edulcorante, tal como menta piperita, salicilato de metilo o saborizante naranja.

[0076] Para la administración mediante inhalación, los compuestos se administran en forma de un spray de aerosol a partir de un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

[0077] La administración sistémica también puede realizarse por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados a la barrera que debe permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos de la técnica, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal puede conseguirse mediante la utilización de sprays nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas, tal como es generalmente conocido de la técnica.

[0078] Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo con bases de suppositorio convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

[0079] En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegen el compuesto frente a la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles biodegradables, tal como vinil-acetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones resultarán evidentes para el experto en la materia. Los materiales también

pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a la infección de células con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) también pueden utilizarse como portadores farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden prepararse según métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo tal como se describe en la patente US nº 4.522.811, incorporada totalmente en la presente memoria como referencia.

[0080] Resulta especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformizar las dosis. La forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que debe tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado al portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención están dictadas y son directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe conseguirse.

[0081] Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador conjuntamente con instrucciones para la administración.

[0082] Las composiciones de la presente invención también puede incluir opcionalmente otros ingredientes terapéuticos, agentes antiapelmazamiento, conservantes, agentes edulcorantes, colorantes, saborizantes, desecantes, plastificadores, pigmentos, glidantes, antiadherentes, agentes antiestáticos, surfactantes (agentes humectantes), antioxidantes, agentes de recubrimiento con película y similares. Cualquiera de dichos ingredientes opcionalmente debe ser compatible con el compuesto indicado en la presente memoria, con el fin de garantizar la estabilidad de la formulación.

[0083] La composición puede contener otros aditivos según se requiera, incluyendo, por ejemplo, lactosa, glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa, rafinosa, maltitol, melezitosa, estaquiosa, lactitol, palatinita, almidón, xilitol, manitol, mioinositol y similares, e hidratos de los mismos, y aminoácidos, por ejemplo alanina, glicina y betaina, y polipéptidos y proteínas, por ejemplo albúmina.

[0084] Entre los ejemplos de excipientes para la utilización como portadores farmacéuticamente aceptables y los portadores inertes farmacéuticamente aceptables y los ingredientes adicionales anteriormente indicados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ligantes, rellenos, desintegrantes, lubricantes, agentes antimicrobianos y agentes de recubrimiento, tales como ligantes: almidón de maíz, almidón de patata, otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, xantano, alginato sódico, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica), polivinilpirrolidona (por ejemplo povidona, crospovidona, copovidona, etc.), metilcelulosa, Methocel, almidón pregelatinizado (por ejemplo Starch 1500® y Starch 1500 LM®, comercializados por Colorcon, Ltd.), hidroxipropilmelcelulosa, celulosa microcristalina (FMC Corporation, Marcus Hook, PA, USA) o mezclas de los mismos; rellenos: talco, carbonato cálcico (por ejemplo gránulos o polvos), fosfato cálcico dibásico, fosfato cálcico tribásico, sulfato cálcico (por ejemplo gránulos o polvos), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, dextrosa, fructosa, miel, lactosa anhidrato, lactosa monohidrato, lactosa y aspartamo, lactosa y celulosa, lactosa y celulosa microcristalina, maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcristalina y amp., goma guar, melaza, sacarosa o mezclas de los mismos; desintegrantes: agar-agar, ácido algínico, carbonato cálcico, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, poliacrililina potásico, glicolato de almidón sódico, almidón de patata o de tapioca, otros almidones, almidón pregelatinizado, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas (tal como gelano), hidroxipropilmelcelulosa de baja sustitución, o mezclas de los mismos; lubricantes: estearato cálcico, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, laurilsulfato sódico, estearilfumarato sódico, lubricante de ácidos grasos de origen vegetal, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de cinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, gel de sílice siloide (Aerosil 200, W.R. Grace Co., Baltimore, MD, USA), un aerosol coagulado de sílice sintético (Deaussa Co., Piano, TX, USA), un dióxido de silicio pirogénico (CAB-O-SIL, Cabot Co., Boston, MA, USA), o mezclas de los mismos; agentes antiapelmazamiento: silicato cálcico, silicato de magnesio, dióxido de silicio, dióxido de silicio coloidal, talco o mezclas de los mismos; agentes antimicrobianos: cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, butilparabeno, cloruro de cetilpiridinio, cresol, clorbutanol, ácido deshidroacético, etilparabeno, metilparabeno, fenol, alcohol feniletilico, fenoxietanol, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, sorbato potásico, propilparabeno, benzoato sódico, deshidroacetato sódico, propionato sódico, ácido sórbico, timerosal, timol, o mezclas de los mismos, y agentes de recubrimiento: carboximetilcelulosa sódica, ftalato de acetato de celulosa, etilcelulosa, gelatina, barniz farmacéutico, hidroxipropilmelcelulosa, hidroxipropilmelcelulosa (hipromelosa), ftalato de hidroxipropilmelcelulosa, metilcelulosa, polietilenglicol, ftalato de acetato de polivinilo, shellac, sacarosa, dióxido de titanio, cera carnauba, cera microcristalina, goma gelano, maltodextrina, metacrilatos, celulosa microcristalina y carragenano o mezclas de los mismos.

[0085] La formulación también puede incluir otros excipientes y categorías de los mismos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, L-histidina, Pluronic®, poloxámeros (tales como Lutrol® y poloxámero 188), ácido ascórbico, glutatión, intensificadores de la permeabilidad (por ejemplo lípidos, colato sódico, acilcarnitina, salicilatos, sales biliares mixtas, micelas de ácidos grasos, quelantes, ácidos grasos, surfactantes, glicéridos de cadena intermedia), inhibidores de proteasa (por ejemplo inhibidor de tripsina de soja, ácidos orgánicos), agentes de reducción del pH e intensificadores de la absorción eficaces en la estimulación de la biodisponibilidad (incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los descritos en las patentes US nº 6.086.918 y nº 5.912.014), cremas y lociones (tales como maltodextrina y carragenanos); materiales para tabletas masticables (tales como dextrosa, fructosa, lactosa monohidrato, lactosa y aspartamo, lactosa y celulosa, maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcrystalina y goma guar, sorbitol cristalino); parenterales (tales como manitol y povidona); plastificadores (tales como sebacato de dibutilo, plastificadores para recubrimientos, ftalato de polivinilacetato); lubricantes en polvo (tales como behenato de glicerilo); cápsulas de gelatina blanda (tales como solución especial de sorbitol); esferas para recubrimiento (tales como esferas de azúcar); agentes de esferonización (tales como behenato de glicerilo y celulosa microcrystalina); agentes de suspensión/gelificantes (tales como carragenano, goma gelano, manitol, celulosa microcrystalina, povidona, glicolato de almidón sódico, goma xantano); edulcorantes (tales como aspartamo, aspartamo y lactosa, dextrosa, fructosa, miel, maltodextrina, maltosa, manitol, melaza, sorbitol cristalino, solución especial de sorbitol, sacarosa); agentes de granulación húmeda (tales como carbonato cálcico, lactosa anhidra, lactosa monohidrato, maltodextrina, manitol, celulosa microcrystalina, povidona, almidón), caramelo, carboximetilcelulosa sódica, saborizante de crema de cereza y saborizantes de cereza, ácido cítrico anhídrico, ácido cítrico, azúcar de pastelería, rojo D&C nº 33, amarillo D&C nº 10, laca de aluminio, edetato disódico, alcohol etílico al 15%, amarillo FD&C nº 6 laca de aluminio, azul FD&C nº 1 laca de aluminio, azul FD&C nº 1, azul FD&C nº 2 laca de aluminio, verde FD&C nº 3, rojo FD&C nº 40, amarillo FD&C nº 6 laca de aluminio, amarillo FD&C nº 6, amarillo FD&C nº 10, palmitoestearato de glicerol, monoestearato de glicerilo, carmín índigo, lecitina, manitol, metil- y propil-parabenos, glicirrizinato monoamónico, saborizante naranja natural y artificial, barniz farmacéutico, poloxámero 188, polidextrosa, polisorbato-20, polisorbato-80, polividona, almidón de maíz pregelatinizado, almidón pregelatinizado, óxido de hierro rojo, sacarina sódica, carboximetil-éter sódico, cloruro sódico, citrato sódico, fosfato sódico, saborizante fresa, óxido de hierro negro sintético, óxido de hierro rojo sintético, dióxido de titanio y cera blanca.

[0086] Las formas de dosificación oral sólidas pueden tratarse opcionalmente con sistemas de recubrimiento (por ejemplo el sistema de recubrimiento con película Opadry® fx, por ejemplo azul Opadry® (OY-LS-20921), blanco Opadry® (YS-2-7063), blanco Opadry® (YS-1-7040), y tinta negra (S-1-8 106).

[0087] Los agentes en su forma libre o como una sal pueden combinarse con un polímero, tal como ácido poliláctico-glicólico (PLGA), ácido poli-(I)-láctico-glicólico (P(I)LGT) (documento nº WO 01/12233), ácido poliglicólico (patente US nº 3.773.919), ácido poliláctico (patente US nº 4.767.628), poli(ε-caprolactona) y poli(óxido de alquieno) (patente US nº 2003/0068384) con el fin de crear una formulación de liberación sostenida. Dichas formulaciones pueden utilizarse para implantes que liberan un polipéptido u otro agente durante un periodo de unos cuantos días, unas cuantas semanas o varios meses según el polímero, el tamaño de partícula del polímero y el tamaño del implante (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.620.422). Otras formulaciones de liberación sostenida y polímeros para la utilización se describen en los documentos nº EP 0 467 389 A2, nº WO 93/24150, nº US 5.612.052, nº WO 97/40085, nº WO 03/075887, nº WO 01/01964 A2, nº US 5.922.356, nº WO 94/155587, nº WO 02/074247A2, nº WO 98/25642, nº US 5.968.895, nº US 6.180.608, nº US 2003/0171296, nº US 2002/0176841, nº US 5.672.659, nº US 5.893.985, nº US 5.134.122, nº US 5.192.741, nº US 5.192.741, nº US 4.668.506, nº US 4.713.244, nº US 5.445.832, nº US 4.931.279, nº US 5.980.945, nº WO 02/058672, nº WO 97/26015, nº WO 97/04744 y nº US 2002/0019446. En dichas micropartículas de formulaciones de liberación sostenida (Delie y Blanco-Prieto, Molecule 10:65-80, 2005) de polipéptidos se combinan con micropartículas de polímero. Pueden introducirse uno o más implantes de liberación sostenida en el intestino grueso, el intestino delgado o ambos. La patente US nº 6.011.0 1 y el documento nº WO 94/06452 describen una formulación de liberación sostenida que proporciona polietilenglicoles (es decir PEG 300 y PEG 400) o triacetina. El documento nº WO 03/053401 describe una formulación que puede incrementar la biodisponibilidad y proporcionar una liberación controlada del agente dentro del tracto GI. Las formulaciones adicionales de liberación controlada se describen en los documentos nº WO 02/38129, nº EP 326151, nº US 5.236.704, nº WO 02/30398, nº WO 98/13029, nº US 2003/0064105, nº US 2003/0138488A1, nº US 2003/0216307A1, nº US 6.667.060, nº WO 01/49249, nº WO 01/49311, nº WO 01/49249, nº WO 01/49311 y nº US 5.877.224, materiales que pueden incluirse los descritos en el documento nº WO 04/041195 (incluyendo el sello y el recubrimiento entérico descrito en el mismo) y recubrimientos sensibles al pH que consiguen la administración en el colon, incluyendo los descritos en los documentos nº US 4.910.021 y nº WO 90/01329. La patente US nº 4.910.021 describe la utilización de un material sensible al pH para recubrir una cápsula. El documento nº WO 90/01329 describe la utilización de recubrimientos sensibles al pH sobre perlas que contienen ácido, en el que el ácido en el núcleo de la perla prolonga la disolución del recubrimiento sensible al pH. La patente US nº 5.175.003 da a conocer una mezcla de polímeros de mecanismo dual de materiales entéricos sensibles al pH y plastificadores formadores de película capaces de proporcionar permeabilidad al material entérico, para la utilización en sistemas de administración de fármaco; un pellet de matriz compuesto de una mezcla de polímeros de mecanismo dual permeada con un fármaco y que en ocasiones recubre un núcleo farmacéuticamente neutro; un pellet recubierto con una membrana, que comprende un pellet de

5 matriz recubierto con una cubierta de mezcla de polímero de mecanismo dual de la misma composición o de composición diferente, y una forma de dosificación farmacéutica que contiene pellets de matriz. El pellet de matriz libera fármacos solubles en ácido mediante la difusión en pH ácido y mediante desintegración a niveles de pH nominalmente aproximadamente 5,0 o superiores.

10 [0088] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden formularse en los sistemas de liberación controlada dirigida e inducida por pH descritos en el documento nº WO 04/052339. Los agentes descritos en la presente memoria pueden formularse según la metodología descrita en cualquiera de entre los documentos nº WO 03/105812 (polímeros hidratables extrusionados), nº WO 02/43767 (traslocadores de membrana cortables enzimáticamente); documentos nº WO 03/007913 y nº WO 03/086297 (sistemas mucoadhesivos); documento nº WO 02/072075 (formulación laminada bicapa que comprende un agente de reducción del pH y un intensificador de la absorción); documento nº WO 04/064769 (polipéptidos amidados); documento nº WO 05/063156 (suspensión de lípidos sólidos que presentan propiedades pseudotrópicas y/o tixotrópicas tras la fusión); documentos nº WO 03/035029 y nº WO 03/035041 (formas de dosificación de retención gástrica erosionables); patentes US nº 5.007.790 y nº 5.972.389 (formas de dosificación de liberación sostenida); documento nº WO 04/112711 (composiciones orales de liberación sostenida); documentos nº WO 05/027878, nº WO 02/072033 y nº WO 02/072034 (composiciones de liberación retardada con goma natural o sintética); documento nº WO 05/030182 (formulaciones de liberación controlada con una tasa de liberación creciente); documento nº WO 05/048998 (sistema microencapsulado); patente US nº 5.952.314 (biopolímero); patente US nº 5.108.758 (administración de matriz de amilosa vítrea); patente US nº 5.840.860 (administración basada en almidón modificado). La patente JP nº 1.0324642 (sistema de administración que comprende quitosano y material gastrorresistente, tal como gliadina o zeína de trigo); las patentes US nº 5.866.619 y nº 6.368.629 (polímero que contiene sacárido); la patente US nº 6.531.152 (describe un sistema de administración de fármaco que contiene un núcleo soluble en agua (pectinato de Ca u otros polímeros insolubles en agua) y una capa externa que estalla (por ejemplo el polímero hidrofóbico Eudragit); las patentes US nº 6.234.464 y nº 6.403.130 (recubrimiento con polímero que contiene caseína y pectina con alto contenido en grupos metoxi; el documento nº WO 01/74175 (producto de la reacción de Maillard); el documento nº WO 05/063206 (formulación de incremento de la solubilidad) y el documento nº WO 04/019872 (proteínas de fusión transferentes).

15 [0089] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden formularse utilizando tecnología de sistema de liberación controlada en el interior de una bolsa inflable, que se introduce en una cápsula de fármaco para la administración oral. Tras la disolución de la cápsula, un sistema de generación de gas hincha la bolsa en el estómago, en donde se retiene durante 16 a 24 horas, liberando durante todo este tiempo los agentes indicados en la presente memoria.

20 [0090] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden formularse en un dispositivo osmótico, incluyendo los datos a conocer en las patentes US nº 4.503.030, nº 5.609.590 y nº 5.358.502. La patente US nº 4.503.030 da a conocer un dispositivo osmótico para dispensar un fármaco en determinadas regiones de pH del tracto gastrointestinal. Más particularmente, la invención se refiere a un dispositivo osmótico que comprende una pared formada de una composición semipermeable sensible al pH que circunda un compartimiento que contiene un fármaco, con un paso a través de la pared que conecta el exterior del dispositivo con el compartimiento. El dispositivo administra el fármaco a una tasa controlada en la región del tracto gastrointestinal que presenta un pH inferior a 3,5, y el dispositivo se autodestruye y libera la totalidad de su fármaco en la región del tracto gastrointestinal que presenta un pH superior a 3,5, proporcionando de esta manera una disponibilidad total para la absorción del fármaco. Las patentes US nº 5.609.590 y nº 5.358.502 dan a conocer un dispositivo de estallido osmótico para dispensar un agente beneficioso en un ambiente acuoso. El dispositivo comprende un agente beneficioso y agente osmótico circundado por lo menos en parte por una membrana semipermeable. El agente beneficioso también puede funcionar como agente osmótico. La membrana semipermeable es permeable al agua y sustancialmente impermeable al agente beneficioso y agente osmótico. Se une unos medios de inducción a la membrana semipermeable (por ejemplo une dos mitades de cápsula). Los medios de inducción resultan activados por un pH de entre 3 y 9 e inducen la administración final, aunque súbita, del agente beneficioso. Estos dispositivos permiten la liberación inducida por el pH del núcleo de agente beneficioso en forma de bolo mediante estallido osmótico.

## AGENTES EJEMPLARES PARA TERAPIA DE COMBINACIÓN

### 55 Agentes analgésicos

60 [0091] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación con un agente analgésico, por ejemplo un compuesto analgésico o un polipéptido analgésico. Estos polipéptidos y compuestos pueden administrarse con los péptidos GCRA descritos en la presente memoria (simultánea o secuencialmente). También pueden opcionalmente unirse covalentemente o unirse a un agente descrito en la presente memoria con el fin de crear conjugados terapéuticos. Entre los agentes analgésicos útiles se encuentran los bloqueantes de canales de Ca, los antagonistas de receptores 5HT (por ejemplo los antagonistas de receptores 5HT3,

5HT4 y 5HT1), los agonistas de receptores opioides (loperamida, fedotozina y fentanilo), los antagonistas de receptores NK1, los agonistas de receptores de CCK (por ejemplo loxiglumida), los antagonistas de receptores NK1, los antagonistas de receptores NK3, los inhibidores de la recaptación de la norepinefrina-serotonina (NSRI), los antagonistas de receptores vanilloides y canabinoides y la sialorfina. Los agentes analgésicos en las diversas clases se encuentran descritos en la literatura.

[0092] Entre los polipéptidos analgésicos útiles se encuentran los polipéptidos relacionados con la sialorfina, incluyendo los que comprende la secuencia de aminoácidos QHNPR (SEC ID nº), incluyendo VQHNPR (SEC ID nº), VRQHNPR (SEC ID nº), VRGQHNPR (SEC ID nº), VRGPQHNPR (SEC ID nº), VRGPRQHNPR (SEC ID nº), VRGPRRQHNPR (SEC ID nº) y RQHNPR (SEC ID nº). Los polipéptidos relacionados con sialorfina se unen a neprilisina e inhiben la degradación mediada por neprilisina de la sustancia P y la Met-encefalina. De esta manera, los compuestos o polipéptidos que son inhibidores de la neprilisina son agentes analgésicos útiles que pueden administrarse con los polipéptidos descritos en la presente memoria en una coterapia o unirse a los polipéptidos descritos en la presente memoria, por ejemplo mediante un enlace covalente. La sialorfina y polipéptidos relacionados se describen en la patente US nº 6.589.750, y en los documentos nº US 2003/0078200 A1 y nº WO 02/051435 A2.

[0093] Los antagonistas y agonistas de receptores de opioides pueden administrarse con los péptidos GCRA descritos en la presente memoria en coterapia o unirse al agente descrito en la presente memoria, por ejemplo mediante un enlace covalente. Por ejemplo, algunos antagonistas de receptores de opioides tales como naloxona, naltrexona, metil-nalozona, nalmefeno, cipridima, beta-funaltrexamina, naloxonazina, naltrindol y nor-binaltorfimina se cree que resultan útiles en el tratamiento de IBS. Puede resultar útil formular antagonistas de opioides de este tipo en una formulación de liberación retrasada y sostenida de manera que la liberación inicial del antagonista se produzca en el intestino delgado intermedio a distal y/o en el colon ascendente. Dichos antagonistas se describen en el documento nº WO 01/32180 A1. El pentapéptido encefalina (HOE825, Tyr-D-Lys-Gly-Phe-L-homoserina) es un agonista de los receptores de opioides mu y delta y se cree que resulta útil para incrementar la motilidad intestinal (Eur. J. Pharm. 219:445, 1992) y este polipéptido puede utilizarse conjuntamente con los polipéptidos descritos en la presente memoria. También resulta útil la trimebutina, que se cree que se une a los receptores de los opioides mu/delta/kappa y activa la liberación de motilina y modula la liberación de la gastrina, el polipéptido intestinal vasoactivo, la gastrina y los glucagones. Los agonistas de receptores del opioide kappa, tales como fedotozina, asimadolina y cetociclamocina y compuestos descritos en los documentos nº WO 03/097051 y nº WO 05/007626 pueden utilizarse conjuntamente o unirse a los polipéptidos descritos en la presente memoria. Además, pueden utilizarse algunos agonistas de receptores del opioide mu, tales como morfina, difeniloxilato, fraquefamida (H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH<sub>2</sub>, documento nº WO 01/019849 A1) y loperamida.

[0094] Tyr-Arg (kiotorfina) es un dipéptido que actúa mediante la estimulación de la liberación de las met-encefalinas, induciendo un efecto analgésico (J. Biol. Chem. 262:8165, 1987). La kiotorfina puede utilizarse conjuntamente o unidos a los péptidos GCRA descritos en la presente memoria.

[0095] El polipéptido derivado de cromogranina (Cg A 47-66; ver, por ejemplo, Ghia *et al.*, Regulatory polypeptides 119:199, 2004) puede utilizarse conjuntamente o unidos a los péptidos GCRA descritos en la presente memoria.

[0096] Algunos agonistas de receptores de CCK tales como la caeruleína de anfibios y otras especies resultan agentes analgésicos útiles que pueden utilizarse conjuntamente o unidos a los péptidos GCRA descritos en la presente memoria.

[0097] Los polipéptidos conotoxina representan una clase grande de polipéptidos analgésicos que actúan como canales del calcio activados por voltaje, receptores de NMDA o receptores nicotínicos. Estos polipéptidos pueden utilizarse conjuntamente o unidos a los polipéptidos descritos en la presente memoria.

[0098] Los análogos peptídicos de la timulina (solicitud de patente FR nº 2830451) pueden presentar actividad analgésica y pueden utilizarse conjuntamente o unidos a los polipéptidos descritos en la presente memoria.

[0099] Los antagonistas de receptores de CCK (CCKa o CCKb), incluyendo la loxiglumida y la desloxiglumida (el isómero R de la loxiglumida) (documento nº WO 88/05774) pueden presentar actividad analgésica y pueden utilizarse conjuntamente o unidos a los polipéptidos descritos en la presente memoria.

[0100] Entre otros agentes analgésicos útiles se incluyen agonistas de 5-HT4 tales como tegaserod (Zelnorm®), mosaprida, metoclopramida, zacoprida, cisaprida, renzaprida, derivados de bencimidazolona, tales como BIMU 1 y BIMU 8, y lirexaprida. Dichos agonistas se describen en los documentos nº EP 1321142A1, nº WO 03/053432A1, nº EP 505322 A1, patente EP nº 505322 B1, patente US nº 5.510.353, documento nº EP 507672 A1, y patentes EP nº 507672 B1 y US nº 5.273.983.

[0101] Algunos bloqueantes de canales del calcio, tales como la ziconotida y compuestos relacionados, descritos en,

por ejemplo, las patentes EP nº 625162 B1, US nº 5.364.842, US nº 5.587.454, US nº 5.824.645, US nº 5.859.186, US nº 5.994.305, US nº 6.087.091, US nº 6.136.786, documentos nº WO 93/13128 A1, nº EP 1336409 A1, nº EP 835126 A1, patentes EP nº 835126 B1, US nº 5.795.864, US nº 5.891.849, US nº 6.054.429 y documento nº WO 97/01351 A1, pueden utilizarse conjuntamente o unidos con los polipéptidos descritos en la presente memoria.

- 5 [0102] Diversos antagonistas de los receptores NK-1, NK-2 y NK-3 (para una revisión ver Giardina *et al.*, Drugs 6:758, 2003) pueden utilizarse conjuntamente o unidos con los polipéptidos descritos en la presente memoria.
- 10 [0103] Algunos antagonistas de receptor de NK1 tales como aprepitant (Merck & Co. Inc.), vofopitant, ezlopitant (Pzifer, Inc.), R-673 (Hoffmann-La Roche Ltd.), SR-48968 (Sanofi Synthelabo), CP-122.721 (Pfizer, Inc.), GW679769 (Glaxo Smith Kline), TAK-637 (Takeda/Abbot), SR-14033 y compuestos relacionados, descritos en, por ejemplo, los documentos nº EP 873753 A1, nº US 2001/0006972 A1, nº US 2003/0109417 A1, nº WO 01/52844 A1, conjuntamente o unidos a los polipéptidos descritos en la presente memoria.
- 15 [0104] Algunos antagonistas de receptores de NK-2 tales como nepadutant (Menarini Ricerche SpA), saredutant (Sanofi-Synthelabo), GW597599 (Glaxo Smith Kline), SR-144190 (Sanofi-Synthelabo) y UK-290795 (Pfizer Inc.) pueden utilizarse conjuntamente o unidos con los polipéptidos descritos en la presente memoria.
- 20 [0105] Algunos antagonistas de receptores de NK3 tales como el osanetant (SR-142801, Sanofi-Synthelabo), SSR-241586, talnetant y compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, los documentos nº WO 02/094187 A2, nº EP 876347 A1, nº WO 97/21680 A1, patente US nº 6.277.862, documentos nº WO 98/11090, nº WO 95/28418, nº WO 97/19927, y Boden *et al.* (J. Med. Chem. 39:1664-75, 1996) pueden utilizarse conjuntamente o unidos con los polipéptidos descritos en la presente memoria.
- 25 [0106] Los inhibidores de la recaptación de la norepinefrina-serotonina (IRNS) tales como el milnaciprano y compuestos relacionados descritos en el documento nº WO 03/077897 A1 pueden utilizarse conjuntamente o unidos a los polipéptidos descritos en la presente memoria.
- 30 [0107] Algunos antagonistas de receptores vanilloides tales como el arvanilo y compuestos relacionados descritos en el documento nº WO 01/64212 A1 pueden utilizarse conjuntamente o unidos a los polipéptidos descritos en la presente memoria.
- 35 [0108] Los polipéptidos y compuestos analgésicos pueden administrarse con los polipéptidos y agonistas descritos en la presente memoria (simultánea o secuencialmente). Los agentes analgésicos también pueden unirse covalentemente a los polipéptidos y agonistas descritos en la presente memoria con el fin de crear conjugados terapéuticos. En el caso de que el analgésico sea un polipéptido y se una covalentemente a un agente descrito en la presente memoria, el polipéptido resultante también puede incluir por lo menos un sitio de corte con tripsina. En el caso de que se encuentre presente dentro del polipéptido, el polipéptido analgésico puede estar precedido (en caso de encontrarse en el extremo carboxi-terminal) o seguido de (en caso de encontrarse en el extremo amino-terminal) 40 un sitio de corte con tripsina que permite la liberación del polipéptido analgésico.
- [0109] Además de los polipéptidos relacionados con la sialorfina, entre los polipéptidos analgésicos se incluyen AspPhe, endomorfina-1, endomorfina-2, nocistatina, dalargina, lupron, ziconótido y sustancia P.
- 45 *Agentes de tratamiento de los trastornos gastrointestinales*
- [0110] Entre los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de los trastornos gastrointestinales y otros trastornos se incluyen agentes para tratar el estreñimiento (por ejemplo un activador de los canales del cloro tales como el ácido graso bicíclico Lubiprostone (anteriormente conocido como SPI-0211, Sucampo Pharmaceuticals, Inc.; Bethesda, MD), un laxante (por ejemplo un laxante formador de masa (por ejemplo polisacáridos no almidón, Colonel Tablet (policarbofilo cálcico), Plantago Ovata®, Equalactin® (policarbofilo cálcico), fibra (por ejemplo Fibercon® (policarbofilo cálcico), un laxante osmótico, un laxante estimulante (tal como difenilmetanos (por ejemplo bisacodilo), antraquinonas (por ejemplo cascara, senna) y laxantes surfactantes (por ejemplo aceite de ricino, docusatos), un agente emoliente/lubricante (tal como aceite mineral, glicerina y docusatos), MiraLax (Braintree Laboratories, Braintree MA), desloxioglumida (Forest Laboratories, también conocido como CR 2017 Rottapharm (Rotta Research Laboratorium SpA)), laxantes salinos, enemas, supositorios y CR 3700 (Rottapharm (Rotta Research Laboratorium SpA); agentes reductores de ácido, tales como inhibidores de bomba protónica (por ejemplo omeprazol (Prilosec®), esomeprazol (Nexium®), lansoprazol (Prevacid®), pantoprazol (Protonix®) y rabeprazol (Aciphex®)), domperidona (Motilium®), eritromicina (y derivados de la misma) o cisaprida (Propulsid®); homólogos de polipéptidos proquineticina, variantes y quimeras de los mismos, incluyendo los indicados en la patente US nº 7.052.674, que pueden utilizarse conjuntamente o unidos a los polipéptidos descritos en la presente memoria; agente promotilidad, tales como el polipéptido derivado de vasostatina, cromogranina A (4-16) (ver, por ejemplo, Ghia *et al.*, Regulatory polypeptides 121:31, 2004) o agonistas de motilina (por ejemplo GM-611 ó fumarato de mitemcinal) o moduladores de receptores

FQ de nociceptina/orfanina (documento nº US 2005/0287067; agonistas o antagonistas de receptor 5HT (por ejemplo 5HT1, 5HT2, 5HT3, 5HT4) completos o parciales (incluyendo antagonistas de 5HT1A (por ejemplo AGI-OO1 (terapéuticos AG1), antagonistas de 5HT2B (por ejemplo PGN 1091 y PGN1 164 (Pharmagene Laboratories Limited) y agonistas del receptor 5HT4 (tales como tegaserod (Zelnorm®), prucalóprido, mosáprido, metoclopramida, zacoprida, 5 cisaprida, renzaprida, derivados de bencimidazolona, tales como BIMU1 y BIMU8, y lirexaprida). Dichos agonistas/moduladores se describen en los documentos nº EP 1321142 A1, nº WO 03/053432A1, nº EP 505322 A1, nº EP 505322 B1, patente US nº 5.510.353, documento nº EP 507672 A1, patente EP nº 507672 B1, y patentes US nº 5.273.983 y nº 6.951.867); agonistas del receptor 5HT3, tales como MKC-733, y antagonistas del receptor 5HT3, tales como DDP-225 (MCI-225, Dynogen Pharmaceuticals, Inc.), cilansetrón (Calmactin®), alosetrón (Lotronex®), ondansetrón HCl (Zofran®), dolasetrón (Anzemet®), palonosetrón (Aloxi®), granisetrón (Kytril®), YM060 (ramosetrón, 10 Astellas Pharma Inc.; el ramosetrón puede administrarse como una dosis diaria de entre 0,002 y 0,02 mg, tal como se describe en la patente EP nº 01588707), y ATI-7000 (Aryx Therapeutics, Santa Clara, CA); agonistas de receptores muscarínicos, agentes antiinflamatorios, antiespasmódicos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, fármacos 15 anticolinérgicos (como dicicloamina (por ejemplo Colimex®, Formulex®, Lomine®, Protylol®, Visceral®, Spasmoban®, Bently®, Bentlylol®), hiosciamina (por ejemplo IB-Stat®, Nulev®, Levsin®, Levbid®, Levsinex Timecaps®, Levsin/SL®, Anaspaz®, A-Spas S/L®, Cystospaz®, Cystospaz-M®, Dormamar®, Colidrops Liquid Pediatric®, Gastrosed®, Hyco Elixir®, Hyosol®, Hyospaz®, Hyosyne®, Losamine®, Medispaz®, Neosol®, Spacol®, Spasdel®, Symax®, Symax SL®), donnatal (por ejemplo Donnatal Extentabs®), clidinio (por ejemplo Quarzan, en combinación con Librium=Librax), metantelina (por ejemplo bantina), mepenzolato (por ejemplo cantilo), homatropina (por ejemplo hycodan, homapina), 20 bromuro de propantelina (por ejemplo, probantina), glicopirrolato (por ejemplo Robinul®, Robinul Forte®), escopolamina (por ejemplo Transderm-Scop®, Transderm-V®), hiosina-N-butilbromuro (por ejemplo Buscopan®), pirenzepina (por ejemplo Gastrozepin®, bromuro de propantelina (por ejemplo Propanthel®), dicicloverina (por ejemplo Merbentyl®), bromuro de glucopirronio (por ejemplo Glycopyrrlate®), hidrobromuro de hioscina, metobromuro de hioscina, metantelino y octatropina); aceite de menta piperita, y relajantes directos de los músculos lisos, tales como bromuro de cimetropio, mebeverina (Duspatal®, Duspatalin®, Colofac MR®, Colotal®), bromuro de otilonio (octilonio), pinaverio (por ejemplo Dicetel® (bromuro de pinaverio, Solvay S.A.)), Spasfon® (floroglucinol hidratado y trimetilfloroglucinol) y trimebutina (incluyendo maleato de trimebutina (Modulon®)); antidepresivos, incluyendo, aunque sin limitarse a los 25 listados en la presente memoria, así como antidepresivos tricíclicos como amitriptilina (Elavil®), desipramina (Norpramin®), imipramina (Tofranil®), amoxapina (Asendin®), nortriptilina; los inhibidores selectivos de la recaptación 30 de la serotonina (ISRS) como la paroxetina (Paxil®), fluoxetina (Prozac®), sertralina (Zoloft®) y citalopram (Celexa®) y otros como doxepina (Sinequan®) y trazodona (Desyrel®); agentes analgésicos de acción central, tales como agonistas de receptores de opioides, antagonistas de receptores de opioides (por ejemplo naltrexona); agentes para el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria; agentes para el tratamiento de la enfermedad de Crohn y/o la colitis ulcerosa (por ejemplo alequel (Enzo Biochem, Inc.; Farmingsale, NY), el polipéptido antiinflamatorio RDP58 35 (Genzyme, Inc.; Cambridge, MA) y Trafacet-ENT™ (ChemoCentryx, Inc.; San Carlos, CA); agentes que tratan el dolor gastrointestinal o vísceral; agentes que incrementan los niveles de GMPc (tal como se describen en el documento nº 2004/0121994), tales como antagonistas de receptores adrenérgicos, antagonistas de receptores de la dopamina e inhibidores de PDE (fostodiesterasa), incluyendo, aunque sin limitarse a los datos a conocer en la presente memoria; purgantes que llevan líquidos al intestino (por ejemplo Visicol®, una combinación de monohidrato de fosfato sódico 40 monobásico y anhidrato de fosfato sódico dibásico), antagonistas de receptores del factor liberador de corticotropina (FLC) (incluyendo NBI-34041 (Neurocrine Biosciences, San Diego, CA), CRH9-41, astresina, R121919 (Janssen Pharmaceutica), CP 154.526, NBI-27914, antalarmina, DMP696 (Bristol-Myers Squibb), CP-316.311 (Pfizer, Inc.), SB723620 (GSK), GW876008 (Neurocrine/Glaxo Smith Kline), ONO-2333Ms (One Pharmaceuticals), TS-041 (Janssen), AAG561 (Novartis) y los datos a conocer en las patentes US nº 5.063.245 y nº 5.861.398, y en los 45 documentos nº US2004/0224964, nº US2004/0198726, nº US2004/0176400, nº US2004/0171607, nº US2004/0110815, nº US2004/0006066 y nº 2005/0209253); polipéptidos similares al glucagón (glp-1) y análogos de los mismos (incluyendo exendin-4 y GTP-010 (Gastrotech Pharma A)) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos (documento nº US 2004/0229867); antidepresivos tricíclicos del tipo dibenzotiazepina, incluyendo, aunque sin limitación, Dextofisopam® (Vela Pharmaceuticals), tianeptina (Stablon®) y otros agentes indicados en la patente US nº 50 6.683.072; éster del nonaetilenglíclico metil-éter del ácido (E)-4-(1,3-bis(ciclohexilmetil)-1,2,3,4-tetrahidro-2,6-diona-9H-purín-8-il)cinámico y compuesto relacionados indicados en el documento nº WO 02/067942; el probiótico Probactrix® (The BioBalance Corporation, New York, NY), que contiene microorganismos que resultan útiles en el tratamiento de los trastornos gastrointestinales; fármacos antidiarreicos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, loperamida (Imodium, Pcptoo Diarrhea), difenoxilato con atropina (Lomotil, Lomocot), colestiramina (Questran, Cholybar), atropina 55 (Cofenótropo, Diarsed, difenoxilato, Lofene, Logen, Loxon, Vi-Atro, inyección de sulfato de atropina) y Xifaxan® (rifaximina, Salix Pharmaceuticals Ltd.), TZP-201 (Tranzyme Pharma Inc.), el bloqueante AGI-004 del receptor neuronal de acetilcolina (nAChR) (AGI Therapeutics) y subsalicilato de bismuto (Pepto-bismol); fármacos ansiolíticos, incluyendo, aunque sin limitación, Ativan (lorazepam), alprazolam (Xanax®), clordiazepóxido/clidinio (Librium®, Librax®), clonazepam (Klonopin®), clorazepato (Tranxene®), diazepam (Valium®), estazolam (ProSom®), flurazepam (Dalmane®), oxazepam (Serax®), prazepam (Centrax®), temazepam (Restoril®), triazolam (Halcion®, Bedelix®) (montmorillonita beidelfítica, Ipsen Ltd.), Solvay SLV332 (ArQuile Inc.), YKP (SK Pharma), asimadolina (Tioga Pharmaceuticals/Merck), AGI-003 (AGI Therapeutics), neuroquinina, incluyendo los indicados en el documento nº 60 US2006/0040950; moduladores de los canales del potasio, incluyendo los indicados en la patente US nº 7.002.015; el

modulador de la serotonina AZD7371 (AstraZeneca Plc); antagonistas del receptor muscarínico M3, tales como darifenacina (Enablex, Novartis AG y zamifenacina (Pfizer)); terapias herbales y naturales, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, acidophilus, manzanilla, aceite de onagra, semillas de hinojo, ajenjo, consuelda y compuestos de Bajo-Ji-Wan (magnolol, honokiol, imperatoria e isoimperatoria), tal como en la patente US nº 6.923.992 y composiciones que comprenden lisina y un agente antiestrés para el tratamiento del síndrome del intestino irritable, tal como se describe en el documento nº EPO 1550443.

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

10 [0111] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación con insulina y compuestos relacionados, incluyendo insulina de primate, roedor o conejo, incluyendo variantes biológicamente activas de los mismos, incluyendo variantes alélicas, más preferentemente insulina humana disponible en forma recombinante. Entre las fuentes de insulina humana se incluyen las formulaciones farmacéuticamente aceptables y estériles, tales como las disponibles de Eli Lilly (Indianapolis, Ind. 46285), tales como Humulin™ (insulina humana de origen ADNr). Ver The Physician's Desk Reference, 55º ed., Medical Economics, Thomson Healthcare, 2001 (que da a conocer otras insulinas humanas adecuadas)).

15 [0112] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria también pueden utilizarse en terapia de combinación con agentes que pueden reforzar los efectos o niveles de la insulina de un sujeto tras la administración, por ejemplo glipizida y/o rosiglitazona. Los polipéptidos y agonistas descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación con Symlin® (acetato de pramlintida) y Exenatide® (exendin-4 sintético, un polipéptido de 39 aminoácidos).

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

20 [0113] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria también pueden utilizarse en terapia de combinación con agentes (por ejemplo Entereg™ (alvimopán, anteriormente denominado adolor/ADL 8-2698), convaptán y agentes relacionados indicados en la patente US nº 6.645.959) utilizados para el tratamiento del íleo postoperatorio y otros trastornos.

#### *Agentes antihipertensivos*

25 [0114] Aunque la presente invención no proporciona ningún tratamiento de la hipertensión, los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación con un agente antihipertensivo, incluyendo, aunque sin limitación, (1) diuréticos, tales como las tiazidas, incluyendo clortalidona, clortiazida, diclorofenamida, hidroflumetiazida, indapamida, politiazida e hidroclorotiazida; diuréticos del asa, tales como bumetanida, ácido etacrínico, furosemida y torsemida; agentes ahorradores del potasio, tales como amilorida y triamtereno; inhibidores de la anhidrasa carbónica, osmóticos (tales como la glicerina) y antagonistas de la aldosterona, tales como espironolactona, epirenona y similares; (2) bloqueantes beta-adrenérgicos, tales como acebutolol, atenolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, esmolol, indenolol, metaprolol, nadolol, nebivolol, penbutolol, pindolol, propanolol, sotalol, tertatolol, tilisolol y timolol, y similares; (3) bloqueantes de los canales del calcio, tales como amlodipina, aranidipina, azelnidipina, barnidipina, benidipina, bepridil, cinaldipina, clevidipina, diltiazem, efondipina, felodipina, galopamil, isradipina, lacidipina, lemildipina, lercanidipina, nicardipina, niledipina, nilvadipina, nimodepina, nisoldipina, nitrendipina, manidipina, prandipina y verapamil, y similares; (4) inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (ACE), tales como benazepril, captoril, ceranapril, cilazapril, delapril, enalapril, enalopril, fosinopril, imidapril, lisinopril, losinopril, moexipril, quinapril, quinaprilat, ramipril, perindopril, quanipril, spirapril, tenocapril, trandolapril y zofenopril, y similares; (5) inhibidores de endopeptidasa neutra, tales como omapatrilat, cadoxatri y ecadotril, fosidotril, sampatrilat, AVE7688, ER4030 y similares; (6) antagonistas de endotelina, tales como texosentán, A308165 e YM62899, y similares; (7) vasodilatadores, tales como hidralazina, clonidina, minoxidilo y alcohol nicotinílico, y similares; (8) antagonistas del receptor de la angiotensina II, tales como aprofartán, candesartán, eprosartán, irbesartán, losartán, olmesartán, paratosartán, tasosartán, telmisartán, valsartán y EXP-3137, FI6828K y RNI6270, y similares; (9) bloqueantes α/β-adrenérgicos, tales como nifradilol, arotinolol y amosulalol, y similares; (10) alfa-1-bloqueantes, tales como terazosín, urapidilo, prazosín, tamsulosín, bunazosín, trimazosín, doxazosín, naftopidilo, indoramina, WHP 164 y XENO1O, y similares; (11) agonistas alfa-2, tales como lofexidina, tiamenidina, moxonidina, rilmenidina y guanobenz, y similares; (12) inhibidores de aldosterona, y similares, y (13) agentes de unión a la angiopoyetina-2, tales como los dados a conocer en el documento nº WO03/030833. Entre los agentes antihipertensivos específicos que pueden utilizarse en combinación con polipéptidos y agonistas descritos en la presente memoria se incluyen, aunque sin limitación, diuréticos tales como tiazidas (por ejemplo clortalidona, ciclotiazida (CAS nº RN 2259-96-3), clorotiazida (CAS nº RN 72956-09-3, que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente US nº 2.809.194), diclorofenamida, hidroflumetiazida, indapamida, politiazida, bendroflumetazida, meticolotiazida, politiazida, triclorometazida, clortalidona, indapamida, metolazona, quinetazona, altiazida (CAS nº RN 5588-16-9, que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente británica nº 902.658), benzotiazida (CAS nº RN 91-33-8, que puede prepararse tal como se da a

conocer en la patente US nº 3.108.097), butiazida (que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente británica nº 861.367) e hidroclorotiazida), diuréticos del asa (por ejemplo bumetanida, ácido etacrínico, furosemida y torasemida), agentes ahorradores de potasio (por ejemplo amilórido y triamtereno (número CAS 396-01-O)) y antagonistas de la aldosterona (por ejemplo espironolactona (número CAS 52-01-7), epirenona y similares); 5 bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos, tales como amiodarona (cordarona, pacerona), hidrocloruro de bunolol (CAS nº RN 31969-05-8, Parke-Davis), acebutolol ( $\pm$ N-[3-acetyl-4-[2-hidroxi-3-[1-metiletil]amino]propoxi]fenil]-butanamida o ( $\pm$ )-3'-acetyl-4'-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]butiranilida), hidrocloruro de acebutolol (por ejemplo Sectral<sup>®</sup>, Wyeth-Ayerst), hidrocloruro de alprenolol (CAS nº RN 13707-88,5, ver la solicitud de patente de Países Bajos nº 6.605.692), atenolol (por ejemplo Tenormin<sup>®</sup>, Astra-Zeneca), hidrocloruro de carteolol (por ejemplo Cartrol<sup>®</sup> Filmtab<sup>®</sup>, Abbott), hidrocloruro de celioprolol (CAS nº RN 57470-78-7, ver también patente US nº 4.034.009), hidrocloruro de cetamolol (CAS nº RN 77590-95-5, ver también la patente US nº 4.059.622), hidrocloruro de labetalol (por ejemplo Normodyne<sup>®</sup>, Schering), hidrocloruro de esmolol (por ejemplo Brevibloc<sup>®</sup>, Baxter), hidrocloruro de levobetaxolol (por ejemplo suspensión oftálmica Betaxon<sup>TM</sup>, Alcon), hidrocloruro de levofenolol (por ejemplo Betagan<sup>®</sup> Liquifilm<sup>®</sup> con C CAP<sup>®</sup> Compliance Cap, Allergan), nadolol (por ejemplo Nadolol, Milan), practolol (CAS nº RN 6673-35-4, ver también la patente US nº 3.408.387), hidrocloruro de propanolol (CAS nº RN 318-98-9), hidrocloruro de sotalol (por ejemplo Betapace AF TM, Berlex), timolol (2-propanol, 1-[(1,1-dimetiletil)amino]-3-[[4-(4-morfolinil)-1,2,5-tiadiazol-3-il]oxi]-hemihidrato, (S)-, CAS nº RN 91524-16-2), sal (1:1) de maleato de timolol-(Z)-2-butanodioato de (S)-1-[(1,1-dimetiletil)amino]-3-[[4-(4-morfolinil)-1,2,5-tiadiazol-3-il]oxi]-2-propanol, CAS nº RN 26921-17-5), bisoprolol (2-propanol, 1-[4-[[2-(1-metiletoxi)etoxi]-metil]fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-, ( $\pm$ ), CAS nº RN 66722-44-9), fumarato de 20 bisoprolol (tal como (E)-2-butanodioato de ( $\pm$ )-1-[4-[[2-(1-metiletoxi)etoxi]-metil]fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-2-propanol (2:1) (sal), por ejemplo Zebeta<sup>TM</sup>, Lederle Consumer), nebivalol (2H-1-benzopirán-2-metanol,  $\alpha,\alpha'$ -[imilobis(metilén)]bis[6-fluoro-3,4-dihidro, CAS nº RN 99200-09-6, ver también la patente US nº 4.654.362), hidrocloruro de cicloprolol, tal como 2-propanol, 1-[4-[2-(ciclopropilmetoxi)etoxi]fenoxi]-3-[1-metiletil]amino]-, hidrocloruro, CAS nº RN 63683-79-3), hidrocloruro de diacetolol (acetamida, N-[3-acetyl-4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]propoxi]fenil]-, monohidrocloruro, CAS nº RN 6976-04-9), hidrocloruro de dilevalol (bezamida, 2-hidroxi-5-[1-hidroxi-2-[1-metil-3-fenilpropil]amino]etil]-, monohidrocloruro, CASA nº RN 75659-08-4), hidrocloruro de exaprolol (2-propanol, 1-(2-ciclohexilfenoxi)-3-[(1-metiletil)amino]-, hidrocloruro, CAS nº RN 59333-90-3), sulfato de flestolol (ácido benzoico, 2-fluoro-, 3-[[2-(aminocarbonil)amino]-dimetiletil]amino]-1-hidroxipropil-éster, (+)-sulfato (1:1) (sal), CAS nº RN 88844-73-9; hidrocloruro de metalol (metanosulfonamida, N-[4-[1-hidroxi-2-(metilamino)propil]fenil]-, 30 monohidrocloruro, CAS nº RN 7701-65-7), metoprolol 2-propanol, 1-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-3-[1-metiletil]amino]-, CAS nº RN 37350-58-6), tartrato de metoprolol (tal como 2-propanol, 1-[4-(2-metoxietil)fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-, por ejemplo Lopressor<sup>®</sup>, Novartis), sulfato de pamatolol (ácido carbámico, [2-[4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]propoxi]fenil]-etil]-, metil-éster, ( $\pm$ )-sulfato (sal) (2:1), CAS nº RN 59954-01-7), sulfato de penbutolol (2-propanol, 1-(2-ciclopentilfenoxi)-3-[1,1-dimetiletil]amino]-, (S)-, sulfato (2:1), (sal), CAS nº RN 38363-32-5), practolol (acetamida, N-[4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]propoxi]fenil]-, CAS nº RN 6673-35-4), hidrocloruro de tiprenolol (propanol, 1-[(1-metiletil)amino]-3-[2-(metiltio)-fenoxi]-hidrocloruro, ( $\pm$ ), CAS nº RN 39832-43-4), tolamolol (benzamida, 4-[2-[[2-hidroxi-3-(2-metilfenoxi)-propil]amino]etoxi]-, CAS nº RN 38103-61-6), bopindolol, indenolol, pindolol, propanolol, tertatolol y tilisolol, y similares; bloqueantes de los canales del calcio, tales como la sal besilato de amiodipina (tal como bencenosulfonato de 3-etil-5-metil-2-(2-aminoetoximetil)-4-(2-clorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridin-carboxilato, por ejemplo Norvasc<sup>®</sup>, Pfizer), maleato de clentiazem (1,5-benzotiazepín-4(5H)-ona, 3-(acetiloxi)-8-cloro-5-[2-(dimetilamino)etil]-2,3-dihidro-2-(4-metoxifenil)-(2S-cis), (Z)-2-butanodioato (1:1), ver también la patente US nº 4.567.195), isradipina (ácido 3,5-piridín-dicarboxílico, 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-piridín-dicarboxilato, ver también la patente US nº 4.466.972); nimodipina (tal como isopropil(2-metoxetil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5-piridín-dicarboxilato, 45 por ejepmlo Nimotop<sup>®</sup>, Bayer), felodipina (tal como etil-metil-4-(2,3-diclorofenil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridín-dicarboxilato, por ejemplo Plendil<sup>®</sup>Extended-Release, AstraZeneca LP), nilvadipina (ácido 3,5-piridín-dicarboxílico, 2-ciano-1,4-dihidro-6-metil-4-(3-nitrofenil)-, 3-metil-5-(1-metiletil)éster, ver también el documento nº USA3799934), nifedipina (tal como ácido 3,5-piridín-dicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, dimetil-éster, por ejemplo tabletas de liberación prolongada Procardia XL<sup>®</sup>, Pfizer), hidrocloruro de diltiazem (tal como 1,5-benzotiazepín-4(5H)-ona, 3-(acetiloxi)-5-[2-(dimetilamino)etil]-2,3-dihidro-2(4-metoxifenil)-, monohidrocloruro, (+)-cis, por ejemplo Tiazac<sup>®</sup>, Forest), hidrocloruro de verapamilo (tal como bencenoacetonitrilo, (alfa)-[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi-(alfa)-1-metiletil)hidrocloruro, por ejemplo Isoptin<sup>®</sup> SR, Knoll Labs), hidroclocoloruro de teludipina (ácido 3,5-piridín-dicarboxílico, 2-[(dimetilamino)metil]-4-[2-[(1E)-3-(1,1-dimetiletoxi)-3-oxo-1-propenil]fenil]-1,4-dihidro-6-metil-, éster dietílico, monohidrocloruro), CAS nº RN 108700-03-4), belfosdilo (ácido fosfónico, [2-(fenoxietil)-1,3-propán-diil]bis-, éster tetrabutílico, CAS nº RN 103486-79-9), fostedilo (ácido fosfónico, [2-(2-fenoxietil)-1,3-propán-diil]bis-, éster tetrabutílico, CAS nº RN 75889-62-2), aranidipina, azelnidipina, barnidipina, benidipina, bepridilo, cinaldipina, clevidipina, efonidipina, galopamilo, lacidipina, lemildipina, lercanidipina, maleato de monatepilo (1-piperazín-butanamida, N-(6,11-dihidrobienzo(b,e)tiepín-11-il)-4-(4-fluorofenil)-, (-)-, (Z)-2-butadioeno (1:1) maleato de ( $\pm$ )-N-(6,11-dihidrobienzo(b,e)tiepín-11-il)-4-(p-fluorofenil)-1-piperazín-butiramida (1:1), CAS nº RN 132046-06-1), nicardipina, nisoldipina, nitrendipina, manidipina, pranidipina y similares; antagonistas de los canales tipo T del calcio, tales como mibepradilo; inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (ACE), tales como benazeprilo, hidrocloruro de benazeprilo (tal como monohidrocloruro de ácido 3-[[1-(etoxicarbonil)-3-fenil-(1S)-propil]amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1H-1-(3S)-beuzazepín-1-acético, por ejemplo Lotrel<sup>®</sup>, Novartis), captopril (tal 50 55 60

como 1-[(2S)-3-mercaptop-2-metilpropionil]-L-prolina, por ejemplo Captopril, Mylan, CAS nº RN 62571-86-2 y otros datos a conocer en la patente US nº 4.046.889), ceranapril (y otros datos a conocer en el documento nº USA4452790), cetapril (alacepril, Dainippon, dado a conocer en Eur. Therap. Res. 39:671, 1986; 40:543, 1986)), cilazapril (Hoffmann-La Roche), dado a conocer en J. Cardiovasc. Pharmacol. 9:39, 1987; indalapril (hidrocloruro de delapril (2H-1,2,4-benzotiadiazín-7-sulfonamida, 3-biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il-6-cloro-3,4-dihidro-, 1,1-dióxido, CAS nº RN 2259-96-3), dado a conocer en la patente US nº 4.385.051), enalapril (y otros datos a conocer en el documento nº USA4168267), fasinopril sódico (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 datos a conocer en la patente US nº 4.168.267), fasinopril sódico (L-prolina, 4-ciclohexil-1-[[R]-[(1S)-2-metil-1-(1-oxopropoxi)propoxi], imidapril, indolapril (Schering, dado a conocer en J. Cardiovasc. Pharmacol. 5:643-655, 1983)), lisinopril (Merck), losinopril, moexipril, hidrocloruro de moexipril (ácido 3-isoquinolín-carboxílico, ácido, 2-[(2S)-2-[(18)-(etoxicarbonil)-3-fenilpropil]amino]-1-oxopropil]-1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-, monohidrocloruro, (3S), CAS nº RN 82586-52-5), quinapril, quinaprilat, ramipril (Hoechst), dado a conocer en la patente nº EP 79022 y en Curr. Ther. Res. 40:74, 1986, perindopril erbumina (tal como ácido 2S,3aS,7aS-1-[(S)-N-[(S)-1-carboxibutil]alanil]hexahidro-indolín-carboxílico, 1-ethyl-éster, compuesto con terc-butilamina (1:1), por ejemplo Aceon®, Solvay), perindopril (Servier, dado a conocer en Eur. J. Clin. Pharmacol. 31:519, 1987), quanipril (dado a conocer en el documento nº USA 4344949), espirapril (Schering, dado a conocer en Acta. Pharmacol. Toxicol. 59(sup.5):173, 1986), tenocapril, trandolapril, zofenopril (y otros datos a conocer en la patente US nº 4.316.906), rentiapril (fentiapril, dado a conocer en Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 10:131, 1983)), pivopril, YS980, teprótido (potenciador de bradiquinia BPP9a, CAS nº RN 35115-60-7), BRL 20 36.378 (Smith Kline Beecham, ver las patentes EP nº 80822 y nº 60668), MC-838 (Chugai, ver CA 102:72588V y Jap. J. Pharmacol. 40:373, 1986; CGS 14824 (Ciba-Geigy, HCl de ácido 3-[(1-etoxicarbonil-3-fenil-(1S)-propil]amino)-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1-(3S)-benzazepín-1-acético, ver la patente UK nº 2.103.614), CGS 16.617 (Ciba-Geigy, ácido 3(S)-[(1S)-5-amino-1-carboxipentil]amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1H-1-benzazepín-1-etanoico, ver la patente US nº 4.473.575), Ru 44570 (Hoechst, ver Arzneimittelforschung 34:1254, 1985; R 31-2201 (Hoffmann-La Roche, ver FEBS 25 Lett. 165:201, 1984)), CI925 (Pharmacologist 26:243-266, 1984), WY-44221 (Wyeth, ver J. Med. Chem. 26:394, 1983) y los datos a conocer en los documentos nº USA 2003/006922 (párrafo 28), nº USA 4337201, nº USA 4432971 (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 datos a conocer en la patente US nº 5.362.727, en el documento nº USA5366973 y en las patentes US 30 nº 5.225.401, nº 4.722.810, nº 5.223.516, nº 4.749.688, nº 5.552.397, nº 5.504.080, nº 5.612.359, nº 5.525.723, y en las patentes EP nº 0599444, nº 0481522, nº 0599444, nº 0595610, nº 0534363, nº 534396, nº 534492 y nº 0629627; antagonistas de endotelina, tales como tezosentán, A308165 e YM62899, y similares; vasodilatadores, tales como hidralazina (apresolina), clonidina (hidrocloruro de clonidina (1H-imidazol-2-amina, N-(2,6-diclorofenil)-4,5-dihidro-, monohidrocloruro, CAS nº RN 4205-91-8), catapres, minoxidilo (Ionitén), alcohol nicotinílico (roniacol), hidrocloruro de 35 diltiazem (tal como 1,5-benzotiazepín-4(5H)-ona, 3-(acetiloxy)-5-[2-(dimetilamino)etyl]-2,3-dihidro-2(4-metoxifenil)-, monohidrocloruro, (+)-cis, por ejemplo Tiazac®, Forest), dinitrato de isosórbito (tal como 2,5-dinitrato de 1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol, por ejemplo Isordil® Titradosé®, Wyeth-Ayerst), mononitrato de sosórbito (tal como 1,4:3,6-dianhidro-D-glucito-1,5-nitrato, un nitrato orgánico, por ejemplo Ismo®, Wyeth-Ayerst), nitroglicerina (tal como trinitrato de 2,3-propanotriol, por ejemplo Nitrostat®, Parke-Davis), hidrocloruro de verapamilo (tal como bencenoacetonitrilo, 40 (±)-(alfa)[3-[(2-(3,4-dimetoxifenil)etyl)metylamino]propil]-3,4-dimetoxi-(alfa)-(1-metiletil)hidrocloruro, por ejemplo Covera HS® de liberación prolongada, Searle), cromonar (que puede prepararse tal como se da a conocer en el documento nº USA3282938), clonitato (Annalen 1870 155), droprenilamina (que puede prepararse tal como se da a conocer en DE nº 2.521.113), lidoflazina (que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente US nº 3.267.104), prenilamina (que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente DE nº 2.521.113), nitrato de proparacil (que 45 puede prepararse tal como se da a conocer en la patente francesa nº 1.103.113), hidrocloruro de mioflazina (1-piperazín-acetamida, 3-(aminocarbonil)4-[4,4-bis(4-fluorofenil)butil]-N-(2,6-diclorofenil)-, dihidrocloruro, CAS nº RN 83898-67-3), mixidina (benceno-etanamina, 3,4-dimetoxi-N-81-metil-2-pirrolidinilidén)-pirrolidina, 2-[(3,4-dimetoxifenil)imino]-1-metil-1-metil-2-[(3,4-dimetoxifenil)imino]pirrolidina, CAS nº RN 27737-38-8), molsidomina (1,2,3-oxadiazolio, 5-[(etoxicarbonil)amino]-3-(4-morfolinil)-, sal interna, CAS nº RN 25717-80-0), mononitrato de 50 isosórbito (D-glucitol, 1,4:3,6-anhidro-, 5-nitrato, CAS nº RN 16051-77-7), tetraniitrato de eritritilo (1,2,3,4-butanotetrol, tetranitrato, (2R,3S)-rel- CAS nº RN 7297-25-8), clonitato (1,2-propanodiol, 3-cloro-, dinitrato (7Cl, 8Cl, 9Cl), CAS nº RN 2162-33-1), dipiridamol etanol, 2,2',2'',-[4,(8-di-1-piperidinil)pirimidido[5,4-d]pirimidín-2,6-dil]dinitrilo]tetrakis-, CAS nº RN 58-32-2), nicorandilo (CAS nº RN 65141-46-0-3), piridín-carboxamida ácido (N-[2-(nitrooxi)etyl]-N-isoldipina-3,5-piridín-dicarboxílico, , 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, metil 2-metilpropil-éster, CAS nº RN 63675-72-9), 55 nifedipina ácido 3,5-piridín-dicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, dimetil-éster, CAS nº RN 21829-25-4), maleato de perhexilina (piperidina, 2-(2,2-diciclohexiletíl)-, (2Z)-2-butanoídoato (1:1), CAS nº RN 6724-53-4), hidrocloruro de oxprenolol (2-propanol, 1-[(1-metiletil)amino]-3-[2-(2-propeniloxy)fenoxy]-, hidrocloruro, CAS nº RN 1607-17-6), verapamilo (bencenoacetonitrilo, hidrocloruro de (±)-(alfa)[3-[(2-(3,4-dimetoxifenil)etyl)metylamino]propil]-3,4-dimetoxi-(alfa)-(1-metiletil), por ejemplo Covera HS® de liberación prolongada, Searle), cromonar (que puede 60 prepararse tal como se da a conocer en el documento nº USA3282938), clonitato (Annalen 1870 155), droprenilamina (que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente DE nº 2521113), lidoflazina (que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente US nº 3.267.104); prenilamina (que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente US nº 3152173), nitrato de proparacil (que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente

francesa nº 1.103.113), hidrocloruro de mioflazina (1-piperazín-acetamida, 3-(aminocarbonil)4-[4,4-bis(4-fluorofenil)butil]-N-(2,6-diclorofenil)-, dihidrocloruro, CAS nº RN 83898-67-3), mixidina (bencenoetanamina, 3,4-dimetoxi-N-(1-metil-2-pirrolidinilidén)-pirrolidina, 2-[(3,4-dimetoxifenetyl)imino]-1-metil-1-metil-2-[(3,4-dimetoxifenetyl)imino]pirrolidina, CAS nº RN 27737-38-8), molsidomina (1,2,3-oxadiazolio, 5-[(etoxicarbonil)amino]-3-(4-morfolinil)-, sal interna CAS nº RN 25717-80-0), mononitrato de isosórbito (D-glucitol, 1,4:3,6-dianhidro-, 5-nitrito, CAS nº RN 16051-77-7), tetranitrato de eritritilo (1,2,3,4-butanotetrol, tetranitrato, (2R,3S)-rel-, CAS nº RN 7297-25-8), clonitrato(1,2-propanodiol, 3-cloro-, dinitrato (7Cl, 8Cl, 9Cl), CAS, nº RN 2612-33-1), dipiridamol etanol, 2,2',2"-[(4,8-di-1-piperidinilpirimidíno[5,4-d]pirimidín-2,6-diil)dinitrilo]tetracis-, CAS nº RN 58-32-2), nicorandilo (CAS, nº RN 65141-46-0 3-), piridín-carboxamida (ácido N-[2-(nitrooxi)etil]-N-isoldipín-3,5-piridín-dicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimel-4-(2-nitrofenil)-, éster de metil 2-metilpropilo, CAS nº RN 63675-72-9), nifedipina (ácido 3,5-piridín-dicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimel-4-(2-nitrofenil)-, éster de dimetilo, CAS nº RN 21829-25-4), maleato de perhexilina (piperidina, 2-(2,2-diciclohexiletil)-, (2Z)-2-butenodioato (1 : 1), CAS nº RN 6724-53-4), hidrocloruro de oxprenolol (2-propanol, 1-[(1-metiletil)amino]-3-[2-(2-propeniloxi)fenoxi]-, hidrocloruro, CAS nº RN 6452-73-9), pentrinitrol (1,3-propanodiol, 2,2-bis[(nitrooxi)metil]-, mononitrato (éster), CAS nº RN 1607-17-6), verapamilo (bencenoacetónitrido, α-[3-[(2-(3,4-dimetoxifenetyl)etil]-metilamino]propil]-3, 4-dimetoxi-α-(1-metiletil)-, CAS nº RN 52-53-9) y similares; antagonistas de receptores de la angiotensina II, tales como arosartán, zolasartán, olmesartán, pratosartán, Fl6828K, RHN6270, candesartán (ácido 1H-bencimidaxol-7-carboxílico, 2-etoxi-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]4-il]metil]-, CAS nº RN 139481-59-7), candesartán cilexetilo (carboxilato de (+/-)-1-(ciclohexilcarboniloxi)etil-2-etoxi-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]-1H-bencimidazol, CAS nº RN 145040-37-5, patentes US nº 5.703.110 y nº 5.196.444), eprosartán (ácido 20 3-[1-4-carboxifenilmetyl]-2-n-butil-imidazol-5-il]-[2-tenilmetyl]propenoico, patentes US nº 5.185.351 y nº 5.650.650), irbesartán (2-n-butil-3- [[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil] 1 ,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-4-ona, documento nº USA 5270317 y patente US nº 5.352.788), losartán (2-N-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]-1H-bencimidazol, CAS nº RN 145040-37-5, patentes US nº 5.703.110 y nº 5.196.444), eprosartán (ácido 25 telmisartán (ácido 4'-[(1,4-dimetil-2'-propil-(2,6'-bi-1H-bencimidazol)-r-il)]-1,1'-bifenil]-2-carboxílico, CAS nº RN 144701-48-4, patente US nº 5.591.762), milfasartán, abitesartán, valsartán (Diovan®) (Novartis), (S)-N-valeril-N-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il)metil]imidazol-5-carboxílico, patentes US nº 5.138.069, nº 5.153.197 y nº 5.128.355), tasosartán (5,8-dihidro-2,4-dimel-8-[(2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,r-bifenil]4-il)metil]-pirido[2,3-d]pirimidín-7(6H)-ona, patente US nº 5.149.699), 30 tetrahidroimidazo[1,2-a]piridín-2-il]-bencimidazol-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]piridín-7(6H)-ona, 3-[2'-carboxibifenil-4-il]metil]-2-ciclopropil-7-metil-3H-imidazo[4,5-b]piridina, ácido 2-butil-4-cloro-1-[(2'-tetrazo[-5-il)bifenil-4-il]metil]imidazol-carboxílico, 1-(etoxicarbonil-oxi)etil-éster de ácido 2-butil-4-cloro-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-il) [1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-carboxílico, sal potásica, 2-butil-4-(metiltio)-1-[[2-[[[(propilamino)carbonil]amino]-sulfonil](1,1'-bifenil)-4-il]metil]-1H-imidazol-5-35 carboxilato dipotásico, 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-tiofencarboxilato, 5-[(3,5-dibutil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]-2-[2- (1H-tetrazol-5-ilfenil)]piridina, sal 6-butil-2-(2-feniletil)-5- [[2'-(1H-tetrazol-5-il)[ 1,1'-bifenil]-4-metil]pirimidín-4-(3H)-ona de D,L-lisina, 5-metil-7-n-propil-8- [[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-[1,2,4]-triazolo[1,5-c]pirimidín-2(3H)-ona, sal potásica de 2,7-dietil-5- [[2'-(5-tetrazolil)bifenil-4-il]metil]-5H-pirazolo[1,5-b][1,2,4]triazol, ácido 2-[2-butil-4,5-dihidro-4-oxo-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-4-40 bifenilmetyl]-3H-imidazol[4,5-c]piridín-5-ilmetil]benzoico, etil éster, sal potásica, 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-bencimidazol-7-carboxílico, ácido 1-[N-(2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il-metil)-N-valerolilaminometil)ciclopentán-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-ethyl-5,7-dimetil-3H-imidazo[4,5-b]piridín-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, tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]pirimidín-6-ona de ácido 2-[[2-butil-1-[(4-carboxifenil)metil]-1H-imidazol-5-il]metil]amino]benzoico, 4(S)-[4-(carboximetil)fenoxi]-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-tetrazaciclopentanafatlén-9-ona, 4-[1-[2'-(1,2,3,4-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metilamino]-5,6,7,8-tetrahidro-2-trifilquinazolina, 2-(2-clorobenzoil)imino-5-etyl-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil-1,3,4-tiazoliac-2-iliidén]aminocarbonil-1-ciclopentenocarbonílico y 1-etoxicarboniloxietil-éster de ácido 2-butil-4-[N-metil-N-(3-metilcrotonoil)amino]-1-[[2-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-1H-imidazol-5 -carboxílico, los datos a conocer en las publicaciones de patente EP475206, EP497150,EP539086, EP539713, EP535463, EP535465, EP542059, EP497121,EP535420, EP407342, 50 EP415886, EP424317, EP435827, EP433983,EP475898, EP490820, EP528762, EP324377, EP323841, P420237,EP500297, EP426021, EP480204, EP429257, EP430709, EP434249,EP446062, EP505954, EP524217, EP514197, EP514198, EP514193,EP514192, EP450566, EP468372, EP485929, EP503162, EP533058,EP467207 EP399731, EP399732, EP412848, EP453210, EP456442,EP470794, EP470795, EP495626, EP495627, EP499414, EP499416,EP499415, EP511791, EP516392, EP520723, EP520724, EP539066,EP438869, EP505893, EP530702, 55 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,  
 5 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,  
 10 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,  
 15 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  
 20 aceptables de los mismos; bloqueantes  $\alpha/\beta$ -adrenérgicos, tales como nipradilol, arotinolol, amosulalol, tosilato de bretilio (CAS nº RN: 61-75-6), mesilato de dihidroergotamina (tal como ergotamán-3', 6', 18-triona, 9,10-dihidro-12'-hidroxi-2'-metil-5'-(fenilmethyl)-(5'(α))-monometanosulfonato, por ejemplo la inyección DHE 45®, Novartis), carvedilol (tal como ( $\pm$ )-1-(carbazol-4-iloxo)-3-[[2-(o-metoxifenoxi)etil]amino]-2-propanol, por ejemplo Coreg®, SmithKline Beecham), labetalol (tal como monohidrocloruro de 5-[1-hidroxi-2-[(1-metil-3-fenilpropil)amino] etil]salicilamida, por ejemplo  
 25 Normodyne®, Schering), tosilato de bretilio (bencenometanaminio, 2-bromo-N-etyl-N,N-dimetil-, sal con ácido 4-metilbencenosulfónico (1:1), CAS, nº RN 61-75-6), mesilato de fentolamina (fenol, 3-[[4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il]metil](4-metilfenil)amino]-, monometanosulfonato (sal), CAS nº RN 65-28-1), tartrato de solipertina (5H-1,3-dioxolo[4,5-f]indol, 7-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-, (2R,3R)-2,3-dihidroxibutanedioato (1:1), CAS nº RN 5591-43-5), hidrocloruro de zolertina (piperazina, 1-fenil-4-[2-(1H-tetrazol-5-il)etil]-, monohidrocloruro (8Cl, 9Cl), CAS nº RN  
 30 7241-94-3) y similares; bloqueantes de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, tal como alfuzosina (CAS nº RN 81403-68-1), terazosina, urapidilo, prazosina (Minipress®), tamsulosina, bunazosina, trimazosina, doxazosina, naftopidilo, indoramina, WHP 164, XENOIO, hidrocloruro de fenspirida (que puede prepararse tal como se da a conocer en la patente US nº 3.399.192), proroxán (CAS nº RN 33743-96-3) e hidrocloruro de labetalol y combinaciones de los mismos;  $\alpha$  2 agonistas, tales como metildopa, HCl de metildopa, lofexidina, tiamenidina, moxonidina, rilmenidina, 35 guanobenz y similares; inhibidores de aldosterona y similares; inhibidores de renina, incluyendo Aliskiren (SPPIOO; Novartis/Speedel); agentes ligantes de la angiotensina-2, tales como los dados a conocer en el documento nº WO03/030833; agentes anti-angina, tales como ranolazina (hidrocloruro 1-piperazín-acetamida, N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil]-, dihidrocloruro, CAS nº RN 95635-56-6), hidrocloruro de betaxolol (2-propanol), hidrocloruro de 1-[4-[2-(ciclopropilmetoxi)etil]fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-, CAS nº RN 63659-19-8), hidrocloruro de  
 40 butoprozina (metanona [4-[3(dibutilamino)propoxi]fenil](2-etyl-3-indolizinil)-, monohidrocloruro, CAS nº RN 62134-34-3), maleato de cinepazet, ácido piperazín-acético, 4-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-, etil-éster, (2Z)-2-butenoídoato (1:1), CAS nº RN 50679-07-7), tosifeno (bencenosulfonamida, 4-metil-N-[[[(1S)-1-metil-2-feniletil]amino]carbonil]-, CAS nº RN 32295-184), hidrocloruro de verapamilo (bencenoacetónitrido, monohidrocloruro de  $\alpha$ -[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi- $\alpha$ -(1-metiletil)-, CAS nº RN 152-114), molsidomina (1,2,3-oxadiazolio, 5-[[(etoxicarbonil)amino]-3-(4-morfolinil)-, sal interna, CAS nº RN 25717-80-0) e hidrocloruro de ranolazina (1-piperazín-acetamida, N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil]-, dihidrocloruro, CAS nº RN 95635-56-6); tosifeno (bencenosulfonamida, 4-metil-N-[[[(1S)-1-metil-2-feniletil]amino]carbonil]-, CAS nº RN 32295-184); estimulantes adrenérgicos, tales como hidrocloruro de guanfacina (tal como hidrocloruro de N-amidino-2-(2,6-diclorofenil)acetamida, por ejemplo, tabletas Tenex®, disponibles de Robins); metildopa-hidroclorotiazida (tal como  
 45 levo-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilalanina) en combinación con hidroclorotiazida (tal como 1,1-dióxido de 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamida, por ejemplo la combinación en forma de tabletas Aldoril®, disponible de Merck), metildopa-clorotiazida (tal como 1,1-dióxido de 6-cloro-2H-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamida y metildopa, tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo Aldoclor®, Merck), hidrocloruro de clonidina (tal como hidrocloruro de 2-2-(2,6-diclorofenilamino)-2-imidazolina y clortaldidona (tal como 2-cloro-5-(1-hidroxi-3-oxo-1-isoindolinil)bencenosulfonamida), por ejemplo Combipres®, Boehringer Ingelheim), hidrocloruro de clonidina (tal como hidrocloruro 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 nº RN 4205-90-7), Hyzaar (Merck; una combinación de losartán e hidroclorotiazida), Co-Diovan (Novartis; una combinación de valsartán e hidroclorotiazida, Lotrel (Novartis; una combinación de benazeprilo y amlodipina) y Caduet (Pfizer; una combinación de amlodipina y atorvastatina), y los agentes dados a conocer en el documento nº US2003/0069221).

*Agentes para el tratamiento de trastornos respiratorios*

[0115] Aunque no proporcionados por la presente invención, los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación con uno o más de los agentes siguientes útiles en el tratamiento de trastornos respiratorios y otros trastornos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: (1)  $\beta$ -agonistas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: albuterol (PRO VENTIL<sup>®</sup>, S ALBUT AMOI<sup>®</sup>, VENTOLIN<sup>®</sup>), bambuterol, bitoterol, clenbuterol, fenoterol, formoterol, isoetarina (BRONKOSOL<sup>®</sup>, BRONKOMETER<sup>®</sup>), metaproterenol (ALUPENT<sup>®</sup>, METAPREL<sup>®</sup>), pirbuterol (MAXAIR<sup>®</sup>), reproterol, rimiterol, salmeterol, terbutalina (BRETHAIRE<sup>®</sup>, BRETHINE<sup>®</sup>, BRICANYL<sup>®</sup>), adrenalina, isoproterenol (ISUPREL<sup>®</sup>), bitartrato de epinefrina (PRIMATENE<sup>®</sup>), efedrina, orciprenilina, fenoterol and isoetarina; (2) esteroides, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, budesónido, bunédosido, butixocort, dexametasona, flunisolida, flucortina, fluticasona, hidrocortisona, metilprednisona, mometasona, prednisolona, prednisona, tipredano, tixocortal, triamcinolona y acetónido de triamcinolona; (3) combinaciones de  $\beta_2$ -agonista-corticosteroide [por ejemplo salmeterol-fluticasona (AD V AIR<sup>®</sup>), formoterol-budesónida (S YMBICORT<sup>®</sup>)]; (4) antagonistas de receptores del leucotrieno D4/antagonistas de leucotrieno/antagonistas de LTD4 (es decir, cualquier compuesto que sea capaz de bloquear, inhibir, reducir o, de otra manera, interrumpir la interacción entre los leucotrienos y el receptor Cys-LT1), incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: zafhiukast, montelukast, montelukast sódico (SINGULAIR<sup>®</sup>), pranlukast, iralukast, poblukast, SKB-106,203 y compuestos que se ha descrito que presentan actividad antagónica de LTD4, descritos en la patente US nº 5.565.473; (5) inhibidores de la 5-lipoxygenasa y/o inhibidores de la biosíntesis de leucotrienos [por ejemplo zileuton y BAY1005 (registro CA nº 128253-31-6)]; (6) antagonistas de receptores de la histamina H1/antihistamínicos (es decir, cualquier compuesto que sea capaz de bloquear, inhibir, reducir o, de otra manera, interrumpir la interacción entre las histaminas y sus receptores), incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: astemizol, acrivastina, antazolina, azatadina, azelastina, astamizol, bromfeniramina, maleato de bromfeniramina, carboxamina, carebastina, cetirizina, clorfeniramina, maleato de clorfeniramina, cimetidina, clemastina, ciclizina, ciproheptadina, descarboetoxiloratadina, dexclorfeniramina, dimetindeno, difenhodramina, difenilpiralina, succinato de doxilamina, doxilarnina, ebastina, efletirizina, epinastina, famotidina, fexofenadina, hidroxizina, hidroxizina, ketotifeno, levocabastina, levocetirizina, levocetirizina, loratadina, meclizina, mepiramina, mequitazina, methdilazina, mianserina, mizolastina, noberastina, norasternizol, noraztemizol, fenindamina, feniramina, picumast, prometazina, pinflamina, pirilamina, ranitidina, temelastina, terfenadina, trimeprazina, tripeleamina y triprolidina; (7) un anticolinérgico, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: atropina, benzotropina, biperidén, flutropio, hiosciamina (por ejemplo Levsin<sup>®</sup>; Levbid<sup>®</sup>; Levsin/SL<sup>®</sup>, Anaspaz<sup>®</sup>, Levsinex timecaps<sup>®</sup>, NuLev<sup>®</sup>), ilutropio, ipratropio, bromuro de ipratropio, metescopolamina, oxibutinina, rispenzepina, escopolamina y tiotropio; (8) un antitusivo, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: dextrometorfano, codeína e hidromorfona; (9) un descongestionante, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: pseudoefedrina y fenilpropanolamina; (10) un expectorante, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: guafenesina, guaicolsulfato, terpina, cloruro amónico, guaicolato de glicerol y glicerol yodado; (11) un broncodilatador, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: teofilina y aminofilina; (12) un antiinflamatorio, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: fluribuprofeno, diclofenac, indometacina, ketoprofeno, S-ketoprofeno, tenoxicam; (13) un inhibidor de PDE (fosfodiesterasa), incluyendo, aunque sin limitarse a los datos a conocer en la presente memoria; (14) un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante [e.g. xolair (también denominado omalizumab), rhuMab y talizumab]; (15) un surfactante pulmonar humanizado, incluyendo formas recombinantes de las proteínas surfactantes SP-B, SP-C o SP-D [e.g. SURFAXIN<sup>®</sup>, anteriormente conocidos como dsc-104 (Discovery Laboratories)], (16) agentes que inhiben los canales epiteliales del sodio (ENaC), tales como amilórido y compuestos relacionados; (17) agentes antimicrobianos utilizados para tratar infecciones pulmonares, tales como aciclovir, amicacina, amoxicilina, doxiciclina, trimetoprina sulfametoaxazol, amfotericina B, azitromicina, claritromicina, roxitromicina, claritromicina, cefalosporinas (cefoxitina, cefmetazol, etc.), ciprofloxacino, etambutol, gentimicina, ganciclovir, imipenem, isoniazida, itraconazol, penicilina, ribavirina, rifampina, rifabutina, amantadina, rimantidina, esteptomicina, tobramicina y vancomicina; (18) agentes que activan la secreción de cloro por canales de cloro dependientes de  $Ca^{++}$  (tales como los agonistas del receptor purinérgico P2Y(2)); (19) agentes que reducen la viscosidad del esputo, tales como la ADNasa 1 recombinante humana (Pulmozyme<sup>®</sup>); (20) agentes antiinflamatorios no esteroideos (acetmetacina, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, alclofenac, alminoprofeno, apazona, aspirina, benoxaprofeno, bezpiperilón, ácido buclóxico, carprofeno, clidanac, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenbufeno, fenclofenac, ácido fenclóxico, fenoprofeno, fentiazac, feprazona, ácido flufenámico, flufenisal, fluprofeno, flurbiprofeno, furofenac, ibufenac, ibuprofeno, indometacina, indoprofeno, isoxepac, isoxicam, ketoprofeno, ketorolac, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, miroprofeno, mofebutazona, nabumetona, oxaprozina, naproxeno, ácido niflúmico, oxaprozina, oxipinac, oxyfenbutazona, fenacetina, fenilbutazona, piroxicam, pirprofeno, pranoprofeno, sudoxicam, tenoxicam, sulfasalazina, sulindac, suprofeno, ácido tiaprofénico, tiopinac, tioxaprofeno, ácido tolfenámico, tolmetina, zidometacina y zomepirac); y (21) terapéuticos antioxidantes aerosolizados, tales como S-nitrosoglutation.

#### 55 Agentes antiobesidad

[0116] Los péptidos GCR descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación con un agente antiobesidad. Entre dichos agentes adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos: inhibidores de 11 $\beta$  HSD-1 (11-beta hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 1), tales como BVT 3498, BVT 2733, 3-(1-adamantil)-4-etil-5-(etiltio)-4H-1,2,4-triazol, 3-(1-adamantil)-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-metil-4H-1,2,4-triazol, 3-adamantanil-4,5,6,7,8,9,10,11,12,3a-decahidro-1,2,4-triazolo[4,3-a][11]annuleno, y los compuestos dados a conocer en los documentos nº WO01/90091, nº WOO 1/90090, nº WOO 1/90092 y nº WO02/072084; antagonistas de 5HT, tales

como los indicados en los documentos nº WO03/037871 y nº WO03/037887, y similares; moduladores de 5HT1a, tales como carbidopa, benserazida y los datos a conocer en la patente US nº 6.207.699, el documento nº WO03/031439, y similares; agonistas de 5HT2c (receptor de la serotonina 2c), tales como BVT933, DPCA37215, IK264, PNU 22394, WAY161503, R-1065, SB 243213 (Glaxo Smith Kline) e YM 348 y los datos a conocer en la patente US nº 3.914.250, y en los documentos nº WO00/77010, nº WO02/36596, nº WO02/48124, WO02/10169, nº WO01/66548, nº WO02/44152, nº WO02/51844, nº WO02/40456 y nº WO02/40457; moduladores del receptor de 5HT6, tales como los indicados en los documentos nº WO03/030901, nº WO03/035061, nº WO03/039547 y similares; acil-estrógenos, tales como oleoil-estrona, datos a conocer en Mar-Grasa, M. et al, Obesity Research 9:202-9, 2001, y la solicitud de patente japonesa nº JP 2000256190; compuestos bicíclicos anorécticos, tales como 1426 (Aventis) y 1954 (Aventis), y los compuestos dados a conocer en los documentos nº WO00/18749, nº WO01/32638, nº WO01/62746, nº WO01/62747 y nº WO03/015769; CB 1 (receptor del cannabinoido-1) antagonistas/agonistas inversos, tales como rimonabant (Acomplia; Sanofi), SR-147778 (Sanofi), SR-141716 (Sanofi), BAY 65-2520 (Bayer) y SLV 319 (Solvay), y los datos a conocer en las publicaciones de patente US4973587, US5013837, US5081122, US5112820, US5292736, US5532237, US5624941, US6028084, US6509367, US6509367, WO96/33159, WO97/29079, WO98/31227, WO98/33765, WO98/37061, WO98/41519, WO98/43635, WO98/43636, WO99/02499, WO00/10967, WO00/10968, WO001/09120, WO01/58869, WO01/64632, WO01/64633, WO01/64634, WO01/70700, WO01/96330, WO02/076949, WO03/006007, WO03/007887, WO03/020217, WO03/026647, WO03/026648, WO03/027069, WO03/027076, WO03/027114, WO03/037332, WO03/040107, WO03/086940, WO03/084943 y EP658546; agonistas de CCK-A (colecistoquinina-A), tales como AR-R 15849, GI 181771 (GSK) JMV-180, A-71378, A-71623 y SR146131 (Sanofi), y los descritos en la patente US nº 5.739.106; CNTF (factores neurotróficos ciliares), tales como GI- 181771 (Glaxo-SmithKline), SR1 46131 (Sanofi Synthelabo), butabindida, PD 170,292 y PD 149164 (Pfizer); derivados de CNTF, tales como Axokine® (Regeneron), y los datos a conocer en los documentos nº WO94/09134, nº WO98/22128 y nº WO99/43813; inhibidores de la dipeptidilpeptidasa IV (DP-IV), tales como isoleucina tiazolidida, valina pirrolidida, NVP-DPP728, LAF237, P93/01, P 3298, TSL 225 (ácido triptofil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolín-3-carboxílico; dado a conocer en Yamada et al, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 8:1537-1540, 1998), TMC-2A/2B/2C, inhibidores de CD26, FE 999011, P9310/K364, VIP 0177, SDZ 274-444, 2-cianopirrolididas y 4-cianopirrolididas, tal como se dan a conocer en Ashworth et al, Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 6, No. 22:1163-1166 y 2745-2748, 1996, y los compuestos dados a conocer en las publicaciones de patente WO99/38501, WO99/46272, WO99/67279 (Probiodrug), WO99/67278 (Probiodrug), WO99/61431 (Probiodrug), WO02/083128, WO02/062764, WO03/000180, WO03/000181, WO03/000250, WO03/002530, WO03/002531, WO03/002553, WO03/002593, WO03/004498, WO03/004496, WO03/017936, WO03/024942, WO03/024965, WO03/033524, WO03/037327 y EP1258476; agonistas/antagonistas de receptores del secretagogo de la hormona del 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 los datos a conocer en USSN 09/662448, solicitud provisional de patente US nº 60/203335, y en US6358951, US2002/049196, US2002/022637, WO01/56592 y WO02/32888; antagonistas/agonistas inversos de H3 (histamina H3), tales como tioperamida, 3-(1H-imidazol-4-il)propil N-(4-pentenil)carbamato), clobenpropit, iodofenpropit, imoproxitán, GT2394 (Gliatech) y A331440, O-[3-(1H-imidazol-4-il)propanol]carbamatos (Kiec-Kononowicz, K. et al., Pharmazie 55:349-55, 2000), antagonistas de receptores de la histamina H3 que contienen piperidina (Lazewska, D. et al., Pharmazie, 56:927-32, 2001, derivados de benzofenona y compuestos relacionados (Sasse, A. et al., Arch. Pharm.(Weinheim) 334:45-52, 2001), N-fenilcarbamatos sustituidos (Reidemeister, S. et al., Pharmazie, 55:83-6, 2000) y derivados de proxifán (Sasse, A. et al., J. Med. Chem. 43:3335-43, 2000) y moduladores de receptores de la histamina H3, tales como los datos a conocer en WO02/15905, WO03/024928 y WO03/024929; derivados de leptina, tales como los datos a conocer en US5552524, US5552523, US5552522, US5521283, WO96/23513, WO96/23514, WO96/23515, WO96/23516, WO96/23517, WO96/23518, WO96/23519 y WO96/23520; leptina, incluyendo la leptina humana recombinante (PEG-OB, Hoffmann-La Roche) y metionil-leptina humana recombinante (Amgen); inhibidores de lipasa, tales como la tetrahidrolipstatina (orlistat/Xenical®), Triton WR1 339, RHC80267, lipstatina, teasaponina, fosfato de dietilumbeliferilo, FL-386, WAY-121898, Bay-N-3176, valilactona, esteracina, ebelactona A, ebelactona B y RHC 80267, y los datos a conocer en las publicaciones de patente WO01/77094, US4598089, US4452813, USUS5512565, US5391571, US5602151, USA4405644, US4189438 y US4242453; moduladores del metabolismo de los lípidos, tales como ácido maslínico, eritrodioíl, ácido ursólico, uvasol, ácido betulínico, betulina y similares, y compuestos dados a conocer en el documento nº WO03/011267; agonistas de Mc4r (receptor de la melanocortina 4), tales como CHIR86036 (Chiron), ME-10142, ME-10145 y HS-131 (Melasure), y los datos a conocer en las publicaciones de patente PCT nº WO99/64002, WO00/74679, WO01/991752, WO01/25192, WO 01/52880, WO01/74844, WO01/70708, 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 los datos a conocer en WO97/19952, WO00/15826, WO00/15790, US20030092041; antagonistas del receptor de la hormona 1 concentradora de melanina (MCHR), tales como T-226296 (Takeda), SB 568849, SNP-7941 (Synaptic), y los datos a conocer en las publicaciones de patente WO 01/21169, WO01/82925, WO01/87834, WO02/051809, WO02/06245, WO02/076929, WO02/076947, WO02/04433, WO02/51809, WO02/083134, WO02/094799, WO03/004027, WO03/13574, WO03/15769, WO03/028641, WO03/035624, WO03/033476, WO03/033480, JP13226269 y JP1437059; moduladores de mGluR5, tales como los datos a conocer en WO03/029210, WO03/047581,

WO03/048137, WO03/051315, WO03/051833, WO03/053922, WO03/059904, y similares; agentes serotoninérgicos, tales como flenfluramina (tales como Pondimin® (Bencenoetanamina, N-etil- alfa-metil-3-(trifluorometil)-, hidrocloruro), Robbins), dexfenfluramina (tal como Redux® (bencenoetanamina, N-etil-alfa-metil-3-(trifluorometil)-, hidrocloruro), Interneuron) y sibutramina ((Meridia®, Knoll/Reductil™), incluyendo mezclas racémicas, como isómeros ópticamente puros (+) y (-), y sales, solventes, hidratos y clatratos farmacéuticamente aceptables y profármacos de los mismos, incluyendo monohidrato de hidrocloruro de sibutramina y sales del mismo, y los compuestos dados a conocer en US4746680, US4806570, y US5436272, US20020006964, WO01/27068 y WO01/62341; inhibidores del transporte de la NE (norepinefrina), tales como GW 320659, despiramina, talsupram y nomifensina; antagonistas de NPY 1, tales como BIBP3226, J-115814, BIBO 3304, LY-357897, CP-671906, GI-264879A, y los datos a conocer en US6001836, WO96/14307, WO01/23387, WO99/51600, WO01/85690, WO01/85098, WO01/85173 y WO01/89528; antagonistas de NPY5 (neuropéptido Y5), tales como 152,804, GW-569180A, GW-594884A, GW-587081X, GW-548118X, FR235208, FR226928, FR240662, FR252384, 1229U91, GI-264879A, CGPT1683A, LY-377897, LY-366377, PD-160170, SR-120562A, SR-120819A, JCF-104 y H409/22 y los compuestos dados a conocer en las publicaciones de patente US6140354, US6191160, US6218408, US6258837, US6313298, US6326375, US6329395, US6335345, US6337332, US6329395, US6340683, EP01010691, EP01044970, WO97/19682, WO97/20820, WO97/20821, WO97/20822, WO97/20823, WO98/27063, WO00/107409, WO00/185714, WO00/185730, WO00/64880, WO00/68197, WO00/69849, WO/0113917, WO01/09120, WO01/14376, WO01/85714, WO01/85730, WO01/07409, WO01/02379, WO01/23388, WO01/23389, WO01/44201, WO01/62737, WO01/62738, WO01/09120, WO02/20488, WO02/22592, WO02/48152, WO02/49648, WO02/051806, WO02/094789, WO03/009845, WO03/014083, WO03/022849, WO03/028726 y Norman et al., J. Med. Chem. 43:4288-4312, 2000; antagonistas de opioide, tales como nalmefeno (REVEX®), 3-metoxinaltrexona, metilnaltrexona, naloxona y naltrexona (por ejemplo PT901; Pain Therapeutics, Inc.) y los datos a conocer en US20050004155 y WO00/21509; antagonistas de orexina, tales como SB-334867-A y los datos a conocer en las publicaciones de patente WO01/96302, WO01/68609, WO02/44172, WO02/51232, WO02/51838, WO02/089800, WO02/090355, WO03/023561, WO03/032991 y WO03/037847; inhibidores de PDE (por ejemplo compuestos que enlentecen la degradación del AMP cíclico (AMPc) y/o GMP cíclico (GMPc) mediante la inhibición de las fosfodiesterasas, lo que puede conducir a un relativo incremento de la concentración intracelular de AMPc y GMPc; son posibles inhibidores de PDE principalmente aquellas sustancias que deben numerarse en la clase que consiste de los inhibidores de PDE3, la clase que consiste de los inhibidores de PDE4 y/o la clase que consiste de los inhibidores de PDE5, en particular las sustancias que pueden designarse como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4 ó como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4/5), tales como los datos a conocer en las publicaciones de patente DE1470341, DE2108438, DE2123328, DE2305339, DE2305575, DE2315801, DE2402908, DE2413935, DE2451417, DE2459090, DE2646469, DE2727481, DE2825048, DE2837161, DE2845220, DE2847621, DE2934747, DE3021792, DE3038166, DE3044568, EP000718, EP0008408, EP0010759, EP0059948, EP0075436, EP0096517, EPO112987, EP0116948, EP10150937, EP0158380, EP0161632, EP0161918, EP0167121, EP0199127, P0220044, EP0247725, EP0258191, EP0272910, EP0272914, EP0294647, EP0300726, EP0335386, EP0357788, EP0389282, EP0406958, EP0426180, EP0428302, EP0435811, EP0470805, EP0482208, EP0490823, EP0506194, EP0511865, EP0527117, EP0626939, EP0664289, EP0671389, EP0685474, EP0685475, EP0685479, JP92234389, JP94329652, JP95010875, US4963561, US5141931, WO9117991, WO9200968, WO9212961, WO9307146, WO9315044, WO9315045, WO9318024, WO9319068, WO9319720, WO9319747, WO9319749, WO9319751, WO9325517, WO9402465, WO9406423, WO9412461, WO9420455, WO9422852, WO9425437, WO9427947, WO9500516, WO9501980, WO9503794, WO9504045, WO9504046, WO9505386, WO9508534, WO9509623, WO9509624, WO9509627, WO9509836, WO9514667, WO9514680, WO9514681, WO9517392, WO9517399, WO9519362, WO9522520, WO9524381, WO9527692, WO9528926, WO9535281, WO9535282, WO9600218, WO9601825, WO9602541, WO9611917, DE3142982, DE1116676, DE2162096, EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345, US6331543, US20050004222 (incluyendo los datos a conocer en las fórmulas I-XIII y en los párrafos 37-39, 85-0545 y 557-577), WO9307124, EP0163965, 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), denbufolina, rolipram, oxagrelato, nitraquazona, Y-590, DH-6471, SKF-94120, motapizona, lixazinona, indolidán, olprinona, atizoram, KS-506-G, dipamilina, 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, mepidamol, anagrelida, ibudilast, amrinona, pimobendán, 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, carbazerán, piroximona, imazodán, CI-930, siguazodán, adibendán, saterinona, SKF-95654, SDZ-MKS-492, 349-U-85, emoradán, EMD-53998, EMD-57033, NSP-306, NSP-307, revizinona, NM-702, WIN-62582 and WIN-63291, enoximone and 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, tadalafilo (Cialis®), teofilina y vardenafil (Levitra®); entre los agonistas del neuropéptido Y2 (NPY2) se incluyen, aunque sin limitación: el polipéptido YY y los fragmentos y variantes del mismo (por ejemplo YY3-36 (PPY3-

36)(N. Engl. J. Med. 349:941, 2003; IKPEAPGE DASPEELNRY YASLRHYLNL VTRQRY (SEC ID nº XXX)) y los agonistas de PYY, tales como los dados a conocer en WO02/47712, WO03/026591, WO03/057235 y WO03/027637; los inhibidores de recaptación de la serotonina, tales como, paroxetina, fluoxetina (Prozac™), fluvoxamina, sertralina, citalopram e imipramina, y los dados a conocer en US6162805, US6365633, WO03/00663, WO01/27060 y WO01/162341; agonistas de la hormona tiroidea  $\beta$ , tales como KB-2611 (KaroBioBMS), y los dados a conocer en WO02/15845, WO97/21993, WO99/00353, GB98/284425, solicitud provisional de patente US nº 60/183.223, y solicitud de patente japonesa nº JP 2000/256190; activadores de la UCP-1 (proteína desacoplante-1), 2 ó 3, tales como el ácido fitánico, el ácido 4-[(E)-2-(5, 6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-1-propenil]benzoico (TTNPB), el ácido retinoico y los dados a conocer en WO99/00123; agonistas de  $\beta_3$  (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, Trecadrina, Zeneca D7114, N-5984 (Nisshin Kyorin), LY-377604 (Lilly), SR 59119A, y los dados a conocer en US5541204, US5770615, US5491134, US5776983, USA488064, USA5705515, US5451677, WO94/18161, WO95/29159, WO97/46556, WO98/04526 y WO98/32753, WO01/74782, WO02/32897, WO03/014113, WO03/016276, WO 03/016307, WO03/024948, WO03/024953 y WO03/037881; agentes noradrenérgicos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, dietilpropión (tal como Tenuate® (1-propanona, 2-(diethylamino)-1-fenil-, hidrocloruro), Merrell), dextroanfetamina (también conocido como sulfato de dextroanfetamina, dexanfetamina, dexedrina, Dexampex, Ferndex, Oxydess II, Robese, Spancap #1), mazindol ((ó 5-(p-clorofenil)-2,5-dihidro-3H-imidazo[2,1-a]isoindol-5-ol), tales como Sanorex®, Novartis o Mazanor®, Wyeth Ayerst), fenilpropanolamina (o bencenometanol, alfa-(1-aminoetyl)-, hidrocloruro), fentermina ((o fenol, 3-[[4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il]etil](4-metilfenil)amino], monohidrocloruro), tal como Adipex-P®, Lemmon, FASTIN®, Smith-Kline Beecham y Ionamin® (Medeva), fendimetrazina ((o (2S,3S)-3,4-Dimetyl-2-fenilmorfolina L-(+)-tartrato (1:1)), tal como Metra® (Forest), Plegine® (Wyeth-Ayerst), Prelu-2® (Boehringer Ingelheim) y Statobex® (Lemmon), tartrato de fendamina (tal como The phorin® (2,3,4,9-tetrahidro-2-metil-9-fenil-1H-indenol[2,1-c]piridina L-(+)-tartrato (1:1)), Hoffmann-LaRoche), metanfetamina (tal como Desoxyn®, Abbot ((S)-N, hidrocloruro de (alfa)-dimetilbencenoetanamina)), y tartrato de fendimetrazina (tal como cápsulas de liberación lenta Bontril®, Amarina (-3,4-dimetil-2-fenilmorfolina tartrato); reguladores positivos/inductores de la oxidación de los ácidos grasos, tales como Famoxin® (Genset); inhibidores de la monamina oxidasa, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, befloxatona, moclobemida, brofaromina, fenoxatina, esuprona, befol, toloxatona, pirlindol, amiflamina, sercloremina, bazinaprina, lazabemida, milacemida, caroxazona y otros compuestos determinados, tales como los dados a conocer en WO01/12176; y otros agentes antiobesidad, tales como los agonistas de 5HT-2, inhibidores de la ACC (acetil-CoA carboxilasa), tales como los descritos en WO03/072197, ácido alfa-lipoico (alfa-LA), AOD9604, supresores del apetito, tales como los indicados en WO03/40107, ATL-962 (Alizyme PLC), benzocaína, hidrocloruro de benzefetamina (Didrex), fucus (Fucus vesiculosus), agonistas de BRS3 (receptor de bombesina subtipo 3), bupropión, cafeína, agonistas de CCK, quitosano, cromo, ácido linoleico conjugado, agonistas de hormona liberadora de corticotropina, dehidroepiandrosterona, inhibidores de la DGAT1 (diacilglicerol aciltransferase-1), inhibidores de la DGAT2 (diacilglicerol aciltransferase-2), inhibidores del transportador de dicarboxilato, efedra, exendina-4 (un inhibidor de gIP-1), inhibidores de la FAS (ácido graso sintasa) (tales como Cerulenina y C75), inhibidores de la resorción de grasas (tales como los indicados en el documento nº 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 (ruda de cabra, lilo), *Garcinia cambodia*, camedro (*Teucrium chamaedrys*), anticuerpos de grelina y antagonistas de grelina (tales como los dados a conocer en los documentos nº WO01/87335 y nº WO02/08250), hormonas polipeptídicas y variantes de las mismas, que afectan a la secreción a partir de las células de los islotes, tales como las hormonas secretina/polipéptido inhibidor gástrico (PIG)/polipéptido intestinal vasoactivo (PIV)/polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PAACP)/polipéptido II de tipo glucagon (GLP-II)/glucentina/familia de genes de glucagon y/o los de la familia génica de adrenomedulina/amilina/polipéptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC), incluyendo agonistas de GLP-1 (polipéptido 1 de tipo glucagón) (por ejemplo (1) exendina-4, (2) las moléculas de GLP-1 descritas en el documento nº US2005/0130891, 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 indicados en los párrafos 17 a 44 del documento nº USA2005/0130891, y derivados de GLP-1-(7-34)COOH y la amida de ácido correspondiente, se utilizan con la fórmula general siguiente: R-NH-HAEGTFTSDVSYLEQQAAKEFIWLVK-CONH<sub>2</sub>, en la que R=H o un compuesto orgánico que presenta entre 1 y 10 átomos de carbono. Preferentemente, R es el residuo de un ácido carboxílico. Resultan particularmente preferentes los residuos de ácido carboxílico siguientes: formilo, acetilo, propionilo, isopropionilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo) y glp-1 (polipéptido-1 de tipo glucagón), antagonistas de glucocorticoide, inhibidores del transportador de glucosa, secretagogos de la hormona del crecimiento (tales como los dados a conocer y específicamente descritos en el documento nº USA5536716), interleuquina-6 (IL-6) y moduladores de los mismos (tal como en el documento nº WO03/057237, y similares), L-carnitina, agonistas de Mc3r (receptor de melanocortina tipo 3), agonistas/antagonistas de MCH2R (hormona 2R concentradora de la melanina), antagonistas de la hormona concentradora de la melanina, agonistas de melanocortina (tales como Melanotan II o los descritos en los documentos nº WO 99/64002 y nº WO 00/74679), hierba de Nomame, inhibidores del transportador del fosfato, compuesto phytopharm 57 (CP 644.673), piruvato, inhibidores de SCD-I (estearoil-CoA desaturasa-1), T71 (Tularik, Inc., Boulder CO), Topiramate (Topimax®, indicado como anticonvulsivo que se ha demostrado que incrementa la pérdida de peso), moduladores de factor de transcripción (tales como los

dados a conocer en el documento nº WO03/026576), inhibidores de la  $\beta$ -hidroxiesteroido deshidrogenasa-1 ( $\beta$ -HSD-I),  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato, p57 (Pfizer), Zonisamida (Zonegran™, indicado como un antiepileptico (que se ha demostrado que conduce a pérdida de peso), y los agentes dados a conocer en el documento nº US2003/0119428, párrafos 20 a 26.

## *Agentes antidiabéticos*

[0117] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en combinación terapéutica con uno o más agentes antidiabéticos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: agonistas de PPAR $\gamma$ , tales como glitazonas (por ejemplo WAY-120,744, AD 5075, balaglitazona, cigitazona, darglitazona (CP-86325, Pfizer), englitazona (CP-68722, Pfizer), isaglitazona (MIT/J&J), MCC- 555 (Mitsubishi, dado a conocer en la patente US nº 5.594.016), pioglitazona (tal como pioglitazona Actos<sup>TM</sup>; Takeda), rosiglitazona (Avandia<sup>TM</sup>; Smith Kline Beecham), maleato de rosiglitazona, troglitazona dada a conocer en la patente US nº 4.572.912), rivoglitzona (CS-O1 1, Sankyo), GL-262570 (Glaxo Welcome), BRL49653 (dado a conocer en el documento nº WO98/05331), CLX-0921, 5-BTZD, GW-0207, LG-100641, JJJ-501 (JPNT/P&U), L-895645 (Merck), R-1197702 (Sankyo/Pfizer), NN-2344 (Dr. Reddy/NN), YM-440 (Yamanouchi), LY-300512, LY-519818, R483 (Roche), T131 (Tularik) y similares y compuestos dados a conocer en 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 hidrocloruro de metformina (hidrocloruro de diamida N,N-dimetilimidodicarbonimídica, tal como Glucophage<sup>TM</sup>, Bristol-Myers Squibb); hidrocloruro de metformina con glibúrido, tal como Glucovance<sup>TM</sup>, Bristol-Myers Squibb); buformina (diamida imidodicarbonimídica, N-butil-); etoformina (1-butil-2-etilbiguanida, Schering A. G.); otras formas de sal de metformina (incluyendo en las que la sal se selecciona de entre el grupo de acetato, benzoato, citrato, ftimarato, embonato, clorofenoxyacetato, glicolato, palmitato, aspartato, metanosulfonato, maleato, parachlorophenoxyisobutyroato, formato, lactato, succinato, sulfato, tartrato, ciclohexanecarboxilato, hexanoato, octanoato, decanoato, hexadecanoato, octadecanoato, bencenosulfonato, trimetoxibenzoato, paratoluenosulfonato, adamantanocarboxilato, glicoxilato, glutamato, pirrolidonacarboxilato, naftalenosulfonato, 1-glucosafosfato, nitrato, sulfito, ditionato y fosfato) y fenformina; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa-IB (PTP-IB), tales como A-401,674, KR 61639, OC- 060062, OC-83839, OC-297962, MC52445, MC52453, ISIS 113715, and those disclosed in WO99/585521, WO99/58518, WO99/58522, WO99/61435, WO03/032916, WO03/032982, WO03/041729, WO03/055883, WO02/26707, WO02/26743, JP2002114768, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; sulfonilureas, tales como acetohexamida (por ejemplo Dymelor, Eli Lilly), carbutamida, clorpropamida (por ejemplo Diabinese<sup>®</sup>, Pfizer), gliamilida (Pfizer), gliclazida (por ejemplo Diamcron, Servier Canada Inc), glimepirida (por ejemplo dada a conocer en la patente US nº 4.379.785, tal como Amarilo, Aventis), glipentida, glipizida (por ejemplo Glucotrol o Glucotrol XL de liberación prolongada, Pfizer), gliquidona, glisolamida, gliburido/glibenclamida (por ejemplo Micronasa o Glinasa Prestab, Pharmacia & Upjohn y Diabeta, Aventis), tolazamida (por ejemplo Tolinase) y tolbutamida (por ejemplo Orinase), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; meglitinidos tales como repaglinida (por ejemplo Prandin<sup>®</sup>, Novo Nordisk), KAD1229 (PF/Kissei) y nateglinida (por ejemplo Starlix<sup>®</sup>, Novartis), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; inhibidores de la  $\alpha$  glucosidó hidrolasa (o inhibidores de glucósido), tales como acarbosa (por ejemplo Precose<sup>TM</sup>, Bayer, dado a conocer en la patente US nº 4.904.769), miglitol (tal como GLYSET<sup>TM</sup>, Pharmacia & Upjohn, dado a conocer en el documento nº USA4639436), camiglibosa (metil-6-desoxi-6-[(2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxi-2-(hidroximetil)piperidino]-alfa-D-glucopiranósido, Marion Merrell Dow), voglibosa (Takeda), adiposina, emiglitatida, pradimicina-Q, salbostatina, CKD-711, MDL-25,637, MDL- 73,945 y MOR 14, y los compuestos dados a conocer en los documentos de patente USA4062950, US4174439, US4254256, US4701559, US4639436, US5192772, US4634765, US5157116, USA5504078, US5091418, US5217877, US51091 y WO 1/47528 (poliaminas); inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, tales como tendamistat, trestatina y Al-3688, y los compuestos dados a conocer en US4451455, US4623714 y US4273765; inhibidores de SGLT2, incluyendo los datos a conocer en US6414126 y US6515117; un inhibidor de aP2, tal como se da a conocer en la patente US nº 6.548.529; secretagogos de la insulina, tales como linoglírido, A-4166, forskilina, dibutiril AMPc, isobutilmetilxantina (IBMX), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; inhibidores de la oxidación de los ácidos grasos, tales como clomoxir y etomoxir, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; antagonistas de A2, tales como midaglizol, isaglidol, deriglidol, idazoxán, earoxán y fluparoxán, y ésteres y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; insulina y compuestos relacionados (por ejemplo miméticos de insulina), tales como biota, LP-100, novarapid, insulina detemir, insulina lispro, insulina glargina, suspensión de insulina cinc (lente y ultralente), Lys-Pro insulina, GLP-1 (1-36) amida, GLP-1 (73-7) (insulina-tropina, dada a conocer en la patente US nº 5.614.492), LY-315902 (Lilly), GLP-I (7-36)-NH2, AL-401 (Autoimmune), determinadas composiciones dadas a conocer en las patentes US nº 4.579.730, nº 4.849.405, nº 4.963.526, nº 5.642.868, nº 5.763.396, nº 5.824.638, nº 5.843.866, nº 6.153.632, nº 6.191.105, y documento nº WO 85/05029, e insulina de primate, roedor o conejo, incluyendo variantes biológicamente activas de los mismos, incluyendo variantes alélicas, más preferentemente insulina humana disponible en forma recombinante (entre las fuentes de insulina humana se incluyen formulaciones farmacéuticamente aceptables y estériles, tales como las disponibles de Eli Lilly (Indianapolis, Ind. 46285) como Humulin<sup>TM</sup> (insulina humana, origen: ADNr); ver también THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 55a Ed., Medical Economics, Thomson

Healthcare, 2001 (que da a conocer otras insulinas humanas adecuadas); no tiazolidindionas, tales como JT-501 y farglitazar (GW-2570/GI-262579), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; agonistas duales PPAR $\alpha$ / $\gamma$ , tales como AR-HO39242 (AstraZeneca), GW-409544 (Glaxo-Wellcome), BVT-142, CLX-0940, GW-1536, GW-1929, GW-2433, KRP-297 (Kyorin Merck; 5-[(2,4-Dioxo tiazolidinil)metil]metoxi-N-[4-(trifluorometil)fenil]metil]benzamida), L-796449, LR-90, MK-0767 (Merck/Kyorin/Banyu), SB 219994, muraglitazar (BMS), tesagliptaz (AstraZeneca), reglitzar (JTT-501) y los datos a conocer en 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, WO031053976, solicitud de patente US nº de serie 09/664.598, presentada el 18 de sept., 2000, Murakami et al., Diabetes 47:1841-1847, 1998, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; otros fármacos sensibilizadores frente a la insulina; agonistas de receptores de VPAC2; moduladores de GLK, tales como los datos a conocer en el documento nº WO03/015774; moduladores del retinoide, tales como los datos a conocer en el documento nº WO03/000249; inhibidores de GSK 3 $\beta$ /GSK 3, tales como 4-[2-(2-bromofenil)-4-(4-fluorofenil)-1H-imidazol-5-il]piridina y los compuestos dados a conocer en WO03/024447, WO03/037869, WO03/037877, WO03/037891, WO03/068773, EP1295884, EP1295885, y similares; inhibidores de la glucógeno fosforilasa (HGLPa), tales como CP-368,296, CP-316,819, BAYR3401 y compuestos dados a conocer en WO01/94300, WO02/20530, WO03/037864, y sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; promotores del consumo de ATP, tales como los datos a conocer en el documento nº WO03/007990; inhibidores de TRB3; ligandos del receptor vanilloide, tales como los datos a conocer en el documento nº WO03/049702; agentes hypoglucémicos, tales como los datos a conocer en los documentos nº WO03/015781 y nº WO03/040114; inhibidores de la glucógeno sintasa quinasa 3, tales como los datos a conocer en el documento nº WO03/035663; agentes tales como los datos a conocer en los documentos nº WO99/51225, nº US2003/0134890, nº WO01/24786 y nº WO03/059870; proteína-1 de unión a ADN sensible a la insulina (IRDBP-I), tal como se da a conocer en el documento nº WO03/057827, y similares; antagonistas de la adenosina A2, tales como los datos a conocer en los documentos nº WO03/035639 y nº WO03/035640, y similares; agonistas de PPAR $\delta$ , tales como GW 501516, GW 590735, y compuestos dados a conocer en JP10237049 y WO02/14291; inhibidores de la dipeptidilpeptidasa IV (DP-IV), tales como isoleucina tiazolidina, NVP-DPP728A (1-[[[2-[(5-cianopiridín-2-il)amino]etil]amino]acetil]-2-ciano-(S)-pirrolidina, dada a conocer por Hughes et al., Biochemistry, 38(36):11597-11603, 1999), P32/98, NVP-LAF-237, P3298, TSL225 (ácido triptofil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolín-3-carboxílico, dado a conocer por Yamada et al., Bioorg. & Med. Chem. Lett. 8:1537-1540, 1998), valina pirrolidida, TMC-2A/2B/2C, inhibidores de CD-26, FE999011, P9310/K364, VIP 0177, DPP4, SDZ 274-444, 2-cianopirrolididas y 4-cianopirrolididas tal como se dan a conocer en Ashworth et al., Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 6, No. 22, páginas 1163 a 1166 y 2745 a 2748, 1996, y los compuestos dados a conocer en las patentes US nº 6.395.767, nº 6.573.287, nº 6.395.767 (entre los compuestos dados a conocer se incluyen BMS-477118, BMS-471211 y BMS 538,305), documentos nº WO99/38501, WO99/46272, WO99/67279, WO99/67278, WO99/61431, WO03/004498, WO03/004496, EP1258476, WO02/083128, WO02/062764, WO03/000250, WO03/002530, WO03/002531, WO03/002553, WO03/002593, WO03/000180, y WO03/000181; agonistas de GLP-I, tales como exendina-3 y exendina-4 (incluyendo el polipéptido sintético de 39 aminoácidos exendina-4, denominado Exenatide<sup>®</sup>), y los compuestos dados a conocer en US2003/087821 y NZ 504256, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; péptidos, incluyendo amlintida y Symlin<sup>®</sup> (acetato de pramlintida); y activadores de glucoquinasa, tales como los datos a conocer en US2002103199 (compuestos heteroaromáticos fusionados) y documento nº WO02/48106 (compuestos propionamida sustituidos con isoindolín-1-ona).

#### *Inhibidores de fosfodiesterasa*

[0118] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación con un inhibidor de fosfodiesterasa. Los inhibidores de PDE son aquellos compuestos que enlentecen la degradación del AMP cíclico (AMPc) mediante la inhibición de las fosfodiesterasas, lo que puede conducir a un incremento relativo de la concentración intracelular de AMPc y/o GMPC. Los posibles inhibidores de PDE son principalmente aquellas sustancias numeradas dentro de la clase que consiste de los inhibidores de PDE3, la clase que consiste de inhibidores de PDE4 y/o la clase que consiste de inhibidores de PDE5, en particular aquellas sustancias que pueden designarse como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4 ó como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4/5. A título de ejemplo, pueden mencionarse inhibidores de PDE tales como los descritos y/o reivindicados en las solicitudes de patente y patentes a continuación: 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, EPO112987, EPO116948, EP0150937, EP0158380, EP0161632, EP0161918, EP0167121, EP0199127, EP0220044, EP0247725, EP0258191, EP0272910, EP0272914, EP0294647, EP0300726, EP0335386, EP0357788, EP0389282, EP0406958, EP0426180, EP0428302, EP0435811, EP0470805, EP0482208, EP0490823, EP0506194, EP0511865, EP0527117, EP0626939, EP0664289, EP0671389, EP0685474, EP0685475, EP0685479, JP92234389, JP94329652, JP95010875, patentes US nº 4.963.561, nº 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, WO953281, WO953282, WO9600218, WO9601825, WO9602541, WO9611917, DE3142982, DE1116676, DE2162096, EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345, US nº 6.331.543, 5 US2005/0004222 (incluyendo los datos a conocer en las fórmulas I a XIII y los párrafos 37 a 39, 85-0545 y 557-577) y WO9307124, EP0163965, EP0393500, EP0510562, EP0553174, WO9501338 y WO9603399. Los inhibidores de PDE5 que pueden mencionarse, a título 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 pueden mencionarse, a título de ejemplo, son: RO-20-1724, MEM 1414 (R1533/R1500; Pharmacia Roche), DENBUFYLLINE, ROLIPRAM, 10 OXAGRELATE, NTTRAQUAZONE, 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, TIBENEELAST, SB-210667, SB-211572, SB-211600, SB-212066, SB-212179, GW-3600, CDP-840, MOPIDAMOL, ANAGRELIDE, 15 IBUDILAST, AMRINONE, PIMOBENDAN, CILOSTAZOL, QUAZINONE y N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxibenzamida. Los inhibidores de PDE3 que pueden mencionarse, a título de ejemplo, son SULMAZOL, AMPIZONA, CILOSTAMIDA, CARBAZERÁN, PIROXIMONA, IMAZODÁN, CI-930, SIGUAZODÁN, ADIBENDÁN, SATERINONA, SKF-95654, SDZ-MKS-492, 349-U-85, EMORADÁN, EMD-53998, EMD-57033, NSP-306, NSP-307, REVIZINONA, NM-702, WIN-62582 y WIN-63291, ENOXIMONA y MILRINONA. Los inhibidores de PDE3/4 que pueden mencionarse, a título de ejemplo, son BENAFENTRINA, TREQUINSINA, ORG-30029, ZARDA VERINA, L-20 686398, SDZ-ISQ-844, ORG-20241, EMD-54622 y TOLAFENTRINA. Entre otros inhibidores de PDE se incluyen: cilomilast, pentoxifilina, roflumilast, tadalafilo (Cialis®), teofillina y vardenafil (Levitra®), zaprinast (específico de PDE5).

#### *Agentes anti-contracciones urinarias*

25 [0119] Aunque no proporcionado por la presente invención, los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación (por ejemplo con el fin de reducir o inhibir las contracciones urinarias) con un agente tocolítico, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, agentes beta-adrenérgicos, sulfato de magnesio, inhibidores de prostaglandina y bloqueantes de los canales del calcio.

#### *Agentes antineoplásicos*

30 [0120] Aunque no proporcionado por la presente invención, los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación con agentes antineoplásicos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, agentes alquilantes, epipodofilotoxinas, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides vinca, antibióticos antraciclina, 35 agentes mostaza nitrogenada y similares. Entre los agentes antineoplásicos particulares pueden incluirse tamoxifeno, taxol, etopósido y 5-fluorouracilo.

[0121] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación (por ejemplo tal como en una composición quimioterapéutica) con terapias antivíricas y de anticuerpos monoclonales.

#### *Agentes para tratar la insuficiencia cardiaca congestiva*

40 [0122] Aunque no proporcionado por la presente invención, los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación (por ejemplo en la prevención/tratamiento de la insuficiencia cardiaca 45 congestiva u otro método descrito en la presente memoria) con el agonista parcial del receptor de nociceptina ORL1 descrito por Dooley *et al.* (The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283(2):735-741, 1997). El agonista es un hexapeptido que presenta la secuencia de aminoácidos Ac-RYY (RK) (WI) (RK)-NH<sub>2</sub> ("el polipeptido de Dooley"), en donde los paréntesis muestran al variación permisible de residuos aminoácidos. De esta manera, el polipeptido de Dooley puede incluir, aunque sin limitación, KYYRW, RYYRWR, KWRYYR, RYYRWK, RYYRWK, RYYRWK (todos los D-aminoácidos), RYYRIK, RYYRIR, RYYKIK, RYYKIR, RYYKWR, RYYWK, RYYRW, RYYRWK, RYYRIK, RYYKWR, RYYWK, RYYRWK y KYYRWK, en donde los residuos aminoácidos se encuentran en la forma L, a menos que se indique lo contrario. Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria también pueden utilizarse 50 en terapia de combinación con modificaciones de conjugado de polipeptido del polipeptido de Dooley descritas en el documento nº WO 0198324.

#### **DOSIS**

55 [0123] Los niveles de dosis de los ingredientes activos en la composición farmacéutica también pueden modificarse de manera que se consiga una concentración transitoria o sostenida del compuesto en un sujeto, especialmente en el sitio de inflamación o área enferma o zona circundante, y resultando en la respuesta deseada. Se encuentra perfectamente comprendido dentro de los conocimientos del experto en la materia iniciar la dosificación del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto deseado e incrementar gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado. Se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular dependerá

de una diversidad de factores, entre ellos el peso corporal, el estado general de salud, la dieta, la historia natural de la enfermedad, la vía y programación de la administración, la combinación con otro u otros fármacos y la gravedad de la enfermedad.

- 5 [0124] Una dosis eficaz de la composición típicamente se encontrará comprendida entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 10 µg y 5 mg del compuesto por cada kilogramo de peso corporal. Los ajustes de la dosis se realizarán utilizando métodos rutinarios de la técnica y se basará en la composición particular utilizada y consideraciones clínicas.
- 10 [0125] Los agonistas de receptores de la guanilato ciclase para la utilización en el tratamiento tal como se ha descrito anteriormente pueden administrarse por vía oral, sistémica o local. Entre las formas de dosificación se incluyen las preparaciones para inhalación o inyección, las soluciones, las suspensiones, las emulsiones, las tabletas, las cápsulas, los ungüentos tópicos y lociones, composiciones transdérmicas, otras formulaciones peptídicas conocidas y análogos de péptidos pegilados. Los agonistas pueden administrarse como agente activo único o en combinación con otros fármacos, por ejemplo un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc y un agente antiinflamatorio. En todos los casos deben administrarse fármacos adicionales a una dosis que resulte terapéuticamente eficaz utilizando la técnica existente como guía. Los fármacos pueden administrarse en una única composición o secuencialmente.
- 15 [0126] Los niveles de dosis del agonista de GCR para la utilización en métodos de la presente invención típicamente son de entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 10.000 mg al día, preferentemente de entre aproximadamente 0,005 mg y aproximadamente 1.000 mg al día. Basándose en la dosis diaria en mg/kg, administrarse en dosis individuales o en dosis divididas, las dosis típicamente son de entre aproximadamente 0,001/75 mg/kg y aproximadamente 10.000/75 mg/kg, preferentemente de entre aproximadamente 0,005/75 mg/kg y aproximadamente 1.000/75 mg/kg.
- 20 [0127] La dosis diaria total de cada inhibidor puede administrarse en el paciente en una única dosis, o en múltiples subdosis. Típicamente, las subdosis pueden administrarse dos a seis veces al día, preferentemente dos a cuatro veces al día, y todavía más preferentemente dos a tres veces al día. Las dosis pueden encontrarse en forma de liberación inmediata o en forma de liberación sostenida suficientemente eficaz para obtener el control deseado sobre la condición médica.
- 25 [0128] El régimen de dosificación para prevenir, tratar, proporcionar alivio o mejorar una condición o trastorno médico, o de otra manera proteger frente a una condición médica o tratar una condición médica con las combinaciones y composiciones de la presente invención se selecciona según una diversidad de factores. Entre estos factores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el tipo, edad, peso, sexo, dieta y condición médica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración, consideraciones farmacológicas tales como la actividad, eficacia, farmacocinética y perfiles toxicológicos de los inhibidores particulares utilizados, si se utiliza un sistema de administración de fármaco y si los inhibidores se administran con otros ingredientes activos. De esta manera, el régimen de dosificación utilizado en la práctica puede variar ampliamente y, por lo tanto, puede apartarse del régimen de dosificación preferente indicado anteriormente.

## EJEMPLOS

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

- 45 [0129] Los péptidos GCRA se sintetizaron utilizando métodos estándares para la síntesis de péptidos en fase sólida. Se seleccionó una estrategia de grupo protector Boc/Bzl o Fmoc/tBu según la escala del péptido que debía producirse. En el caso de cantidades más pequeñas, resulta posible obtener el producto deseado utilizando un protocolo Fmoc/tBu, aunque para cantidades mayores (1 g o más), Boc/Bzl es superior.
- 50 [0130] En cada caso se inició el péptido GCRA mediante la utilización de una resina Wang (Fmoc) o Merrifield (Boc) o Pam (Boc) precargada. Para productos con Leu C-terminal se utilizó resina Fmoc-Leu-Wang (D-1115) o Boc-Leu-Pam (D-1230) o Boc-Leu-Merrifield (D-1030). De esta manera, para péptidos que contenían D-Leu C-terminal, la resina era la resina Fmoc-dLeu-Wang (D-2535) y Boc-dLeu-Merrifield y Boc-dLeu-Pam (Bachem Producto D-1230 y D-1590, respectivamente) (SP-332 y análogos relacionados). Para los péptidos producidos como amidas C-terminales, se utilizó una resina con conector Ramage (Bachem producto D-2200) (Fmoc) o mBHA (Boc) (Bachem producto D-1210), cargándola con el residuo C-terminal como primera etapa de la síntesis.

#### *Descripción general de Fmoc-tBu*

- 60 [0131] Cada ciclo sintético consistía de la desprotección con piperidina al 20% en DMF. Los lavados de la resina se llevaron a cabo alternando DMF e IpOH, para hinchar y encoger la resina, respectivamente. La síntesis peptídica alargó la cada del extremo C-terminal al extremo N-terminal. La reacción de activación para cada aminoácido se realizó

con HBTU/DIEA en un exceso de 4 veces durante 45 minutos. En reacciones químicas automatizadas, se acopló doblemente cada aminoácido para maximizar la eficiencia de acoplamiento. Para garantizar la posición correcta de los enlaces disulfuro, se introdujeron los residuos Cys como Cys(Acm) en las posiciones 15 y 7. Se situó Cys(Trt) en Cys4 y Cys12. Esta estrategia de grupo protector rindió el topoisómero correcto como el producto dominante (75:25) (para análogos de enterotoxina, se utilizó un tercer grupo protector de enlace disulfuro (Mob)).

5 [0132] Para los péptidos que contenían grupos Aeea (aminoetiloxietiloxiacetilo) C-terminales, estos se acoplaron con un conector de amida Ramage utilizando la misma reacción de activación anteriormente indicada mediante la utilización de un derivado de Aeea protegido con Fmoc. La numeración de Cys en estos casos sigue siendo la misma, 10 así como la posición de los grupos protectores. Para los péptidos que contenían la extensión N-terminal de Aeea, se incrementó la numeración de los residuos Cys por tres; Cys4 se convierte en Cys7; Cys12 se convierte en Cys15; Cys7 se convierte en Cys10 y Cys15 se convierte en Cys18. La última pareja se protege con Acm y la primera pareja mantiene los grupos Trt.

15 [0133] Para los análogos que contienen sustituciones de D-aminoácidos, estos se introdujeron directamente mediante la incorporación del derivado correctamente protegido en la posición deseada utilizando la misma reacción de activación indicada en el presente documento. Para las estrategias de Fmoc, se utilizaría Fmoc-dAsn(Trt)-OH, Fmoc-dAsn(Xan)-OH, Fmoc-dAsp(tBu)-OH o Fmoc-dGlu(tBu)-OH y para las estrategias de Boc, Boc-dAsn(Xan)-OH, Boc-dAsn(Trt)-OH, Boc-dAsp(Chx), Boc-dAsp(Bzl)-OH, Boc-dGlu(Chx)-OH o Boc-dGlu(Bzl)-OH.

20 [0134] Cada péptido se cortó del soporte de fase sólida utilizando un cóctel de corte de TFA:H<sub>2</sub>O:triisopropilsilano (8,5:0,75:0,75) ml/g de resina durante 2 h a TA. El péptido desprotegido en bruto se filtró para eliminar las perlas de resina agotadas y se precipitó en éter dietílico helado.

25 [0135] Se introdujo cada enlace disulfuro ortogonalmente. Brevemente se disolvió el producto sintético en bruto en agua que contenía NH<sub>4</sub>OH para incrementar el pH a 9. Tras la solubilización completa del producto, se estableció el enlace disulfuro entre los residuos de Cys protegidos con Trt mediante titulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El producto monocíclico se purificó mediante RP-HPLC. El producto monocíclico purificado se trató posteriormente con una solución de yodo para eliminar simultáneamente los grupos protectores Acm e introducir el segundo enlace disulfuro.

30 [0136] Para los análogos de enterotoxina, se eliminó el grupo Mob mediante tratamiento del producto dicíclico con TFA al 85% que contenía DMSO al 10% y tioanisol al 5% durante 2 h a TA.

35 [0137] A continuación se purificó cada producto mediante RP-HPLC utilizando un sistema tampón de combinación de TEAP en H<sub>2</sub>O frente a MeCN, seguido de TFA en H<sub>2</sub>O frente a MeCN. Se agruparon las fracciones altamente puras y se liofilizaron. El producto final se convirtió en sal acetato utilizando el intercambio iónico con resina Dow-Ex cargada con acetato o mediante RP-HPLC utilizando una etapa de lavado con base (NH<sub>4</sub>OH) seguido de AcOH al 1% en agua frente a MeCN.

40 [0138] También resulta posible preparar análogos de enterotoxina utilizando una metodología de oxidación aleatoria utilizando Cys(Trt) en Fmoc o Cys(MeB) en Boc. Tras el corte, pueden formarse los enlaces disulfuro utilizando parejas redox de intercambio de disulfuros, tales como glutatión (red/ox) y/o cisteína/cistina. Este procedimiento rinde un producto plegado en el que deben determinarse las parejas disulfuro ya que no existe ningún modo de conocer su posición directamente.

#### 45 Procedimiento Boc-Bzl

[0139] La síntesis peptídica se inicia en una resina Merrifield o Pam precargada o con mBHA para los péptidos producidos como amidas C-terminales. Cada ciclo sintético consiste de una etapa de desprotección con TFA al 50% 50 en MeCl<sub>2</sub>. La resina se lava repetidamente con MeCl<sub>2</sub> y MeOH. La sal TFA formada se neutraliza con un lavado básico de TEA al 10% en MeCl<sub>2</sub>. La resina se lava con MeCl<sub>2</sub> y MeOH y finalmente con DMF antes de las etapas de acoplamiento. Se lleva a cabo un ensayo colorimétrico para determinar que se ha realizado la desprotección. Cada acoplamiento se encuentra mediado por diisopropil-carbodiimida con HOBT para formar el éster activo. Se deja que se produzca cada acoplamiento durante 2 h a TA o durante la noche en acoplamientos difíciles. Se llevan a cabo re-acoplamientos con reactivos de uronio o fosfonio hasta obtener un ensayo colorimétrico negativo para las aminas primarias libres. A continuación se lava la resina con DMF, MeCl<sub>2</sub> y MeOH y se prepara para la etapa de fase sólida siguiente. La protección de Cys utiliza Cys(Acm) en las posiciones 7 y 15, y Cys(MeB) en Cys4 y Cys12.

[0140] El corte y protección simultáneos se consiguen mediante el tratamiento con HF utilizando anisol como secuestrante (9:1:1)m1:m1:g (resina) a 0°C durante 60 minutos. El péptido seguidamente se extrae de la resina y se precipita en éter helado. La introducción de enlaces disulfuro y la purificación sigue exactamente el mismo protocolo indicado anteriormente para el producto producido con Fmoc.

**EJEMPLO 2: ESTABILIDAD PROTEOLÍTICA *IN VITRO* UTILIZANDO LA DIGESTIÓN CON LÍQUIDO GÁSTRICO SIMULADO (LGS)**

[0141] La estabilidad del péptido GCRA según la invención se determinó en presencia de líquido gástrico simulado (LGS). Se incubó péptido GCRA (concentración final: 8,5 mg/ml) en LGS (peptona proteosa (8,3 g/litro, Difco), D-glucosa (3,5 g/litro, Sigma), NaCl (2,05 g/litro, Sigma), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,6 g/litro, Sigma), CaCl<sub>2</sub> (0,11 g/litro), KCl (0,37 g/litro, Sigma), bilis porcina (concentración 1X final: 0,05 g/litro, Sigma) en PBS, lisozima (concentración 1X final: 0,10 g/litro, Sigma) en PBS, pepsina (concentración 1X final: 0,0133 g/litro, Sigma) en PBS). Se preparó LGS el día del experimento y se ajustó el pH a 2,0 ± 0,1 utilizando HCl o NaOH, según resultase necesario. Tras el ajuste del pH, se filtró a esterilidad el LGS con filtros de membrana de 0,22 µm. Se incubó SP-304 (concentración final: 8,5 mg/ml) en LGS a 37°C durante 0, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos en alícuotas por triplicado. Tras las incubaciones, las muestras se congelaron instantáneamente en hielo seco y después se almacenaron en un congelador a -80°C hasta el ensayo por duplicado.

**EJEMPLO 3: ESTABILIDAD PROTEOLÍTICA *IN VITRO* UTILIZANDO LA DIGESTIÓN CON LÍQUIDO INTESTINAL SIMULADO (LIS)**

[0142] También se evaluó la estabilidad del péptido GCRA frente a la digestión con líquido intestinal simulado (LIS). Se preparó la solución de LIS mediante el método descrito en la Farmacopea estadounidense, 24a edición, p2236. La receta para preparar la solución de LIS se indica posteriormente. La solución de LIS contiene NaCl (2,05 g/litro, Sigma), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,6 g/litro, Sigma), CaCl<sub>2</sub> (0,11 g/litro), KCl (0,37 g/litro, Sigma) y pancreatina (10 mg/ml). Se ajustó el pH a 6 y la solución se filtró a esterilidad. Se incubó una solución de SP-304 (8,5 mg/ml) en SGF a 37°C durante 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 300 minutos en alícuotas por triplicado. Tras las incubaciones, se extrajeron muestras y se congelaron instantáneamente con hielo seco y se almacenaron en un congelador a -80°C hasta el ensayo por duplicado.

[0143] Se evaluó la integridad del péptido GCRA mediante HPLC mediante la utilización de esencialmente el método descrito para la digestión con LGS.

**EJEMPLO 4: ENSAYOS DE ESTIMULACIÓN CON GMP CÍCLICO**

[0144] La capacidad del péptido GCRA de unirse y activar el receptor de GC-C intestinal se sometió a ensayo mediante la utilización de la línea celular de carcinoma de colon humano T84. Se obtuvieron las células de carcinoma de colon T84 humano de la American Type Culture Collection. Las células se cultivaron en una mezcla 1:1 de medio F-12 de Ham y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de feto bovino al 10%, 100 U de penicilina/ml y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células fueron alimentadas con medio fresco cada tres días y se dividieron a una confluencia de aproximadamente 80%.

[0145] Se sometió a ensayo la actividad biológica de los péptidos GCRA tal como se ha indicado anteriormente (15). Brevemente, se lavaron monocapas confluyentes de células T-84 en placas de 24 pocillos dos veces con 250 µl de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4), se preincubaron a 37°C durante 10 minutos con 250 µl de DMEM que contenía HEPES 50 mM (pH 7,4) e isobutilmetilxantina (IBMX) 1 mM, seguido de la incubación con péptidos GCRA (0,1 nM y 10 µM) durante 30 minutos. Se aspiró el medio y se terminó la reacción mediante la adición de ácido perclórico al 3%. Tras la centrifugación y neutralización con NaOH 0,1 N, se utilizó el sobrenadante directamente para las mediciones de GMPC utilizando un kit de ELISA (Caymen Chemical, Ann Arbor, Mich.).

**EJEMPLO 5: PÉPTIDOS PEGILADOS**

[0146] La otra estrategia para convertir a los péptidos en más resistentes a las digestiones con proteasas digestivas es pegilarlos en los extremos N- y C-terminal. El péptido GCRA se pegiló con el grupo ácido aminoetiloxy-etiloxy-acético (Aeea) en el extremo C-terminal (o en el extremo N-terminal o en ambos extremos). Se midió la síntesis de GMPC cíclico en células T84 mediante el método descrito anteriormente.

**EJEMPLO 6: COMBINACIÓN DE AGONISTAS DE RECEPTORES DE GUANILATO CICLASA CON INHIBIDORES DE FOSFODIESTERASA**

[0147] La regulación de las concentraciones intracelulares de nucleótidos cílicos (es decir, AMPc y GMPC) y, de esta manera, la señalización mediante estos segundos mensajeros, se considera generalmente gobernada por sus tasas de producción frente a sus tasas de destrucción dentro de las células. De esta manera, los niveles de GMPC en los tejidos y órganos también pueden regularse a partir de los niveles de expresión de las fosfodiesterasas específicas de GMPC (GMPC-PDE), que generalmente se encuentran sobreexpresadas en el cáncer y en las enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, una combinación consistente de un agonista de GC-C con un inhibidor de GMPC-PDE podría producir un efecto sinérgico sobre los niveles de GMPC en los tejidos y órganos diana.

[0148] La sulindac sulfona (SS) y el zaprinast (ZAP) son dos de los inhibidores conocidos de GMPc-PDE y se ha demostrado que inducen la apoptosis de células de cáncer mediante un mecanismo dependiente del GMPc. Se evaluaron la SS y el ZAP en combinación con el péptido GCRA para determinar si estos inhibidores de PDE presentaban algún efecto sinérgico sobre la acumulación intracelular del GMPc.

5

#### **EJEMPLO 7: ESTUDIO DE TOXICIDAD**

[0149] El objetivo del estudio era determinar la toxicidad de los péptidos GCRA según la invención tras una única administración mediante sonda oral en monos Cynomolgus y realizar una evaluación de la reversibilidad de los posibles cambios tras un periodo mínimo de observación/lavado de 7 días. Se administró cada péptido GCRA según la invención a dosis niveles de dosis diferentes.

10

##### Diseño experimental

[0150] El ensayo (por ejemplo los péptidos GCRA según la invención) y el control/vehículo se administraron en tres etapas separadas por un periodo de observación mínimo de 7 días. Cada etapa consistía de una única administración mediante sonda oral en monos Cynomolgus hembra tal como se indica en las tablas, posteriormente.

15

Etapa 1:

[0151] Se transfirieron ocho monos Cynomolgus hembra previamente expuestos, desde la reserva de monos de ITR y se asignaron a cuatro grupos de dosis, de la manera siguiente:

20

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

[0152] Tras completar la dosificación de la etapa 1, todos los monos fueron observados durante 33 días. Tras completar el periodo de observación, todos los monos fueron transferidos nuevamente a la reserva de monos de ITR.

25

Etapa 2:

[0153] Los mismos ocho monos Cynomolgus hembra ya expuestos previamente utilizados en la Etapa 1 fueron transferidos de la reserva de monos de ITR y fueron asignados a cuatro grupos de dosis, de la manera siguiente:

30

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

[0154] Tras completar la dosificación de la Etapa 2, todos los monos fueron observados durante un mínimo de 7 días.

35

##### Vía de administración

[0155] Se seleccionó la vía de administración oral debido a que es una vía terapéutica humana preferente.

40

##### Preparación de artículos de ensayo y control/vehículo

[0156] Los artículos de ensayo y control/vehículo se prepararon frescos el día de la administración en agua destilada fría (mantenida en un baño de agua helada). Se añadió una cantidad suficiente del artículo de ensayo en polvo a la cantidad apropiada de agua destilada con el fin de alcanzar la concentración deseada. Las formulaciones de dosis e mezclaron mediante simple inversión.

45

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

50

[0157] Para la posible confirmación de la concentración y estabilidad del artículo de ensayo en la formulación, se extrajeron muestras representativas de la parte intermedia de cada concentración, incluyendo el artículo de

control/vehículo el primer día de dosificación de cada grupo, tal como se indica posteriormente. Las muestras se recogieron inmediatamente después de la preparación el día 1 y nuevamente tras completar la administración ese mismo día y se almacenaron bajo congelación (aproximadamente -80°C, valor nominal) en viales de tapa enrosicable de 20 ml. Por lo tanto, los viales de formulación de dosis restantes se devolvieron al departamento de farmacia tan pronto como resultó posible tras completar las administraciones.

5 [0158] Grupo 1: 1,5 ml por duplicado de la parte intermedia el día 1 (predosis y postdosis).

10 [0159] Grupo 2: 1,5 ml por duplicado de la parte intermedia el día 1 (predosis y postdosis).

10 [0160] Grupo 3: 1,5 ml por duplicado de la parte intermedia el día 1 (predosis y postdosis).

15 [0161] Grupo 4: 1,5 ml por duplicado de la parte intermedia el día 1 (predosis y postdosis).

15 [0162] Las formulaciones se mantuvieron frías en un baño de agua helada durante todos los procedimientos de muestreo.

20 [0163] Las formulaciones se agitaron continuamente con una barra de agitación durante un mínimo de 15 minutos previamente al muestreo.

20 [0164] Las muestras se conservaron congeladas (aproximadamente a -80°C, valor nominal) en ITR hasta la petición por parte del patrocinador del envío a un laboratorio designado por el patrocinador para el análisis. Las muestras pueden descartarse tras determinar el analista y el director del estudio que ya no resultan necesarias. Esta eliminación de las muestras se registra en los datos en bruto.

25 [0165] En caso de que se analizasen, un informe de formulación de dosis fue preparado por el investigador principal (análisis de formulación) y proporcionado a ITR para la inclusión en el informe final.

#### Sistema de ensayo

30 [0166]

Especie/cepa:

Mono Cynomolgus (*Macaca fascicularis*)

Origen:

Worldwide Primates Inc.,

P.O. Box 971279

Miami, Florida, 33187, USA

Y

Covance Research Products, Inc.

P.O. Box 549

Alice, Texas, 78333, USA

Nº total de monos en el estudio:

8 hembras expuestas previamente

INtervalo de pesos corporales

2 a 4 kg al inicio del tratamiento

Intervalo de edades al inicio:

Adulto joven al inicio del tratamiento

Periodo de aclimatación:

Los animales se transfirieron de la reserva de monos del ITR. Por lo tanto se consideran totalmente aclimatados al ambiente de laboratorio.

35 [0167] Los intervalos reales de edad y peso corporal se indican en el informe final.

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

40 [0168] Los artículos de ensayo y control/vehículo se administraron mediante sonda gástrica utilizando una sonda nasogástrica unida a una jeringa en tres etapas separadas por un periodo mínimo de observación/lavado de 7 días.

40 Cada sesión de administración consistía de una única administración mediante sonda oral. La sonda oral se enjuagó con 3 ml de agua de ósmosis inversa inmediatamente después de la administración de la formulación de dosis con el fin de certificar que el volumen completo de la dosis había sido administrado en el animal. El volumen de dosis era de 10 ml/kg para todos los animales, incluyendo los controles. El volumen real administrado en cada mono el día 1 de cada etapa se calculó utilizando los pesos corporales del día 1 de cada etapa.

45 [0169] Se mantuvieron frías las formulaciones de dosis introduciéndolas en un baño de agua helada.

[0170] Las formulaciones de administración deben colocarse en una placa de agitación durante un mínimo de 15 minutos antes del inicio de la administración y mantenerse sobre la placa de agitación durante la totalidad del

procedimiento de administración.

[0171] Las formulaciones de administración deben utilizarse dentro de las 2 horas siguientes a su preparación.

5    **Observaciones clínicas**

[0172] Se registraron los signos clínicos observados en la jaula (mala salud, cambios de portamiento, etc.) tal como se indica posteriormente, excepto los días de examen clínico detallado, en donde los signos clínicos en la jaula se sustituyeron por un examen clínico detallado (ECD). Durante los exámenes periódicos de signos clínicos en la jaula y exámenes detallados, se prestó especial atención a las deposiciones con respecto a la cantidad producida, descripción de las mismas, etc.

[0173] Las observaciones de signos clínicos en las jaulas se llevaron a cabo de la manera siguiente:

15   [0174] Durante el periodo de pretratamiento y durante los periodos de observación de (mínimo) 7 días: tres veces al día con un mínimo de 3 horas entre cada ocasión.

[0175] El día de administración de la etapa 1: predosis, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la administración.

20   [0176] El día de administración de la etapa 2: predosis, continuamente durante las primeras 4 horas posteriores a la administración y 6, 8 y 24 horas después de la administración.

[0177] El día de administración de la etapa 3: predosis, continuamente durante las primeras 4 horas posteriores a la administración y 6, 8 y 24 horas después de la administración.

25   [0178] Se llevó a cabo un examen clínico detallado una vez en el momento de la transferencia de los animales y una vez a la semana posteriormente.

30   [0179] Los animales con un estado de salud considerado merecedor de una evaluación adicional fueron examinados por un veterinario clínico o un técnico que trabajaba bajo la supervisión del veterinario clínico. Cualquier tratamiento recomendado por el veterinario sólo se llevaba a cabo tras obtener la aprobación del director del estudio. En caso de resultar posible, se consultó el patrocinador antes de administrar los fármacos terapéuticos.

35   [0180] Se registraron los pesos corporales para todos los animales una vez al día entre el día de transferencia y el final del estudio.

[0181] Se registró el consumo de alimentos para todos los animales una vez al día entre el día de la transferencia y el final del estudio.

40   [0182] Las jaulas se limpian antes del inicio del consumo diario de alimentos para asegurarse de que no quedaban galletas alimentarias dentro de la jaula. Los monos fueron alimentarios 7 galletas antes de las 12 del mediodía y 7 galletas después de las 12 del mediodía. Se registró la suma del número total de galletas proporcionadas durante el día.

45   [0183] La mañana siguiente se llevó a cabo una comprobación visual para comprobar cuántas galletas quedaban en la jaula. Se registró el número total de galletas que quedaban en la tolva de los alimentos o sobre la bandeja. Se restó el número de galletas enteras del número total de galletas proporcionadas con el fin de calcular el número de galletas ingeridas.

50   **EJEMPLO 8: MODELO DE RATÓN LACTANTE DE SECRECIÓN INTESTINAL (ENSAYO DE SUMI)**

[0184] Los péptidos GCRA descritos en la presente memoria pueden someterse a ensayo para su capacidad de incrementar la secreción intestinal utilizando un modelo de ratón lactante de secreción intestinal. En este modelo, se administra un péptido GCRA a ratones lactantes de entre siete y nueve días de edad. Tras sacrificar los ratones, se diseccionó el tracto gastrointestinal entre el estómago y el ciego ("intestinos"). El resto ("carcasa"), así como los intestinos, se pesaron y se calculó la proporción de pesos de intestinos a carcasa. En el caso de que la proporción fuese superior a 0,09, puede concluirse que el compuesto de ensayo incrementa la secreción intestinal. Entre los controles para este ensayo pueden incluirse SP-304 de tipo salvaje, polipéptido ST y Zelnorm®. Modelo de contorsiones inducidas por fenilbenzoquinona.

60   [0185] El modelo de contorsiones inducidas por PBQ puede utilizarse para evaluar la actividad de control del dolor del péptido GCRA descrito en la presente memoria. Este modelo ha sido descrito por Siegmund *et al.* (Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 95:729-731, 1957). Brevemente, una hora después de la administración oral de un compuesto de ensayo,

por ejemplo un péptido GCRA, morfina o vehículo, se inyecta una solución de fenilbenzoquinona (PBQ) al 0,02% (12,5 ml/kg) por vía intraperitoneal en el ratón. Se registra el número de estiramientos y contorsiones entre el quinto y décimo minutos posteriores a la inyección de PBQ y también puede contarse entre los minutos 35 y 40 y entre los minutos 60 y 65 con el fin de proporcionar una evaluación cinética. Los resultados se expresan como número de estiramientos y contorsiones (media ± SEM) y el porcentaje de variación del umbral nociceptivo se calcula a partir del valor de la media del grupo tratado con vehículo. La significancia estadística de cualesquiera diferencias entre los grupos tratados y el grupo de control se determina mediante una prueba de Dunnett utilizando la varianza residual tras un análisis unidireccional de la varianza ( $P<0,05$ ) utilizando el software SigmaStat.

#### 10 EJEMPLO 9: DETERMINACIÓN DE PROPIEDAD FARMACOCINÉTICA DE LOS PÉPTIDOS GCRA

[0186] Se extrajeron muestras de suero de la sangre completa de ratones expuestos (ratones en los que se habían administrado por vía oral o intravenosa uno o más de los péptidos descritos en la presente memoria) y de control y seguidamente se inyectaron directamente (10 ml) en una columna en línea de extracción en fase sólida (SPE) (columna Waters Oasis HLB de 25 µm, conexión directa, de 2,0x15 mm) sin procesamiento adicional. La muestra en la columna SPE se lavó con una solución de 5% de metanol y 95% de dH<sub>2</sub>O (2,1 ml/min, 1,0 minuto), se cargó en una columna analítica utilizando un interruptor de válvula que coloca la columna SPE en un camino de flujo invertido en la columna analítica (columna Waters Xterra MS C8 5 µm IS, 2,1x20 mm). La muestra se eluyó de la columna analítica con un gradiente de fase inversa (fase móvil A: hidróxido amónico 10 mM en dH<sub>2</sub>O; fase móvil B: hidróxido amónico 10 mM en 80% de acetonitrilo y 20% de metanol; 20% de B durante los primeros 3 minutos, incrementando gradualmente hasta 95% de B en 4 minutos, con mantenimiento durante 25 minutos, siempre a un caudal de 0,4 ml/min). A los 9,1 minutos, el gradiente vuelve a las condiciones iniciales de 20% de B durante 1 minuto; se eluye el polipéptido de la columna analítica y se detecta mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo (MRM, 764 (estado de carga +2)>182 (estado de carga +1) Da; voltaje de cono=30 V; colisión=20 eV; resolución parental: 2 Da en el pico de base; resolución hijo=2 Da en pico de base). Se convirtió la respuesta del instrumento en unidades de concentración mediante la comparación con una curva estándar utilizando cantidades conocidas de uno o más polipéptidos sintetizados químicamente preparados e injectados en plasma de ratón utilizando el mismo procedimiento.

[0187] De manera similar, se determinaron las propiedades farmacocinéticas en ratas utilizando la metodología de CL/EM. Se extrajeron muestras de plasma de rata que contenían el péptido GCRA utilizando una placa de extracción en fase sólida (SPE) de 96 pocillos Waters Oasis MAX. Se mezcló un volumen de 200 µl de plasma de rata con 200 µl de polipéptido marcado con <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N en el pocillo de una placa SPE preparada. Las muestras se pasaron por la fase estacionaria con un vacío de 15 mm de Hg. Todas las muestras se enjuagaron con 200 µl de hidróxido amónico al 2% en agua, seguido de 200 µl de metanol al 20% en agua. Las muestras se eluyeron con volúmenes consecutivos de 100 µl de 5/20/75 de ácido fórmico/agua/metanol y 100 µl de 5/15/80 ácido fórmico/agua/metanol. Las muestras se secaron bajo nitrógeno y se resuspendieron en 100 µl de metanol al 20% en agua. Las muestras se analizaron con un espectrómetro de masas Waters Quattro Micro acoplado a una bomba binaria Waters 1525 con un automuestreador Waters 2777. Se inyectó un volumen de 40 µl de cada muestra en una columna Thermo Hypersil GOLD C18 (2,1x50 mm, 5 µm). El polipéptido se eluyó con un gradiente durante 3 minutos con acetonitrilo y agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,05%. El espectrómetro de masas Quattro Micro se hizo funcionar en modo de seguimiento de múltiples reacciones (MRM) utilizando las transiciones de masas de, por ejemplo, 764>182 ó 682>136. Utilizando esta metodología, se administró por vía oral polipéptido y mediante IV en ratas a una dosis de 10 mg/kg. Se determinaron las propiedades farmacocinéticas, incluyendo el área bajo la curva y la biodisponibilidad.

#### 45 EJEMPLO 10: EXPERIMENTOS RELACIONADOS CON LA DIURESIS. EFECTO SOBRE LA DIURESIS Y LA NATRIURESIS

[0188] El efecto de los péptidos GCRA descritos en la presente memoria sobre la diuresis y la natriuresis puede determinarse utilizando metodología similar a la descrita en el documento nº WO06/001931 (Ejemplos 6 (p42) y 8 (p45)). Brevemente, se infusión el polipéptido/agonista descrito en la presente memoria (180 pmoles) durante 60 minutos en un grupo de 5 ratones o primates anestesiados. Dado un volumen estimado de plasma de rata de 10 ml, la tasa de infusión era de aproximadamente 3 pmoles/ml/min. Se realizó un seguimiento de la presión sanguínea, la producción de orina y la excreción de sodio durante aproximadamente los 40 minutos anteriores a la infusión, durante la infusión y durante aproximadamente los 50 minutos posteriores a la infusión, con el fin de medir el efecto de los péptidos GCRA sobre la diuresis y la natriuresis. A título comparativo, se infusión un grupo de control de cinco ratas con solución salina estándar. Puede evaluarse la excreción de orina y sodio. También puede determinarse la respuesta a las dosis. Se infusión por vía intravenosa polipéptido/agonista de GC-C en ratones o primates durante 60 minutos. Se recolectó orina a intervalos de 30 minutos hasta 180 minutos después de terminar la infusión de polipéptido/agonista de GC-C y se determinó el volumen de orina, la excreción de sodio y la excreción de potasio para cada intervalo de recolección. Se realizó un seguimiento continuo de la presión sanguínea. Para cada dosis puede determinarse una relación de dosis-respuesta para el volumen de orina, y la excreción de sodio y potasio. También se determinó la concentración en plasma del polipéptido/agonista de GC-C antes y después de la infusión i.v.

[0189] Experimento de diuresis de ratón o primate. Tras alcanzar un nivel apropiado de anestesia, se insertó un catéter de poliuretano estéril en la uretra y se fijó utilizando 1-2 gotas de adhesivo de unión de uso veterinario aplicado en la unión de uretra/catéter. A continuación se administró en los animales vehículo o artículo de ensayo por vía intravenosa o intraperitoneal. Se dejó que los animales recuperasen la conciencia y se registró periódicamente para cada rata el volumen de orina excretado durante un periodo de 1 a 5 horas.

#### Referencias:

1. Currie, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA 89:947-951 (1992).
- 10 2. Hamra, et al., Proc. Natl Acad. Sci USA 90: 10464- 10468 (1993) .
3. Forte, L., Reg. Pept. 81:25-39 (1999).
4. Schulz, et al., Cell 63:941-948 (1990). 5. Guba, et al, Gastroenterology 777:1558-1568 (1996).
6. Joo, et al, Am. J. Physiol. 274:G633-G644 (1998).
7. Evan, et al., Nature (London) 477:342-348 (2001).
- 15 8. Eastwood, G., J. Clin. Gastroenterol. 14:S29-33 (1992).
9. Lipkin, M. Arch. Fr. Mal. Appl Dig. (57:691-693 (1972). 10. Wong, et al, Gut 50:212-211 (2002).
11. Potten, et al, Stem Cells 75:82-93.
12. Basoglu, et al, in: Proceedings of the Second FEPS Congress, June 29- July 4, 1999, Prague, Czech Republic, If2.cuni.cz/physiolres/feps/basoglu
- 20 13. Sindic, et al, J. Biol. Chem. March 11, 2002, manuscript M1 10627200 (in press).
14. Askling, J., Dickman, P.W., Karlen, P., Brostrom, O., Lapidus, A., Lofberg, R., and Ekbom, A. *Colorectal cancer rates among first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study.* Lancet, 357: 262-266,
- 25 15. Provenzale, D. and Onken, J. *Surveillance issues in inflammatory bowel disease: Ulcerative colitis.* J Clin Gastroenterol, 32:99-105, 2001.
16. Ettorre, G.M, Pescatori, M., Panis, Y., Nemeth, J., Crescenzi, A., and Valleur, P. *Mucosal changes in ileal pouches after restorative proctocolectomy for ulcerative and Crohn's colitis.* Dis Colon Rectum, 43: 1743-1748, 2000.
17. Shinozaki M, Watanabe T, Kubota Y, Sawada T, Nagawa H, Muto T. *High proliferative activity is associated with dysplasia in ulcerative colitis.* Dis Colon Rectum, 43:S34-S39, 2000.
- 30 18. Deschner, E. E., Winawer, S.J., Katz, S., Katzka, L, and Kahn, E. *Proliferative defects in ulcerative colitis patients.* Cancer Invest, 1:41-47, 1983.
19. Wong, W.M., and Wright, N. A. *Cell proliferation and gastrointestinal mucosa.* J Clin Pathol, 52:321-333.
20. Potten, C. S., Wilson, J.W., and Booth, C. *Regulation and significance of apoptosis in the stem cells.* Stem Cells, 15:82-93.
- 35 21. Bhakdi, et al, Infect. Immun. 57:3512-3519 (1989).
22. Hughes, et al, J. Biol. Chem. 272:30567-30576 (1997).
23. Cermak, et al, Pflugers Arch. 43:511-511 (1996). 24. Wu, et al, J. Biol. Chem. 272: 14860-14866 (1997).
25. Shailubhai et al, Cancer Research 60, 5151-5157 (2000)
26. Shailubhai et al., Curr. Opin. Drug Disc. Dev. 5(2): 261-268, 2002.
- 40 27. Collins, SM. J Clin Gastroenterol 41 Suppl 1:S30-32 (2007)
28. Ramamoorthy S et al., J Biol Chem. 282(16): 1 1639-1 1647 (2007)
29. Shailubhai et al., *Guanilib, an agonist of Guanylate C, is a newclass of oral drug candidate that ameriorates inflammation in models of experimental colitis,* [abstract]: In Crohn's and Colitis Foundation of America, 2007.
30. Shailubhai et al., *Guanilib, an agonist of Guanylate C, is a newclass of oral drug candidate for GI disorders and colon cancer,* [abstract]: In GTCbio, 2008.
- 45 31. Shailubhai et al., *SP-304 to Treat GI Disorders- Effects of a Singke, Oral Doseof SP-304 In Safety, Tolerability, Pharmaokinetics and Pharmacodynamics in Healthy Volunteers,* [abstract]: In Digestive Disease Week, 2009.
32. Shailubhai et al., *Guanylin Peptides: New Class of Oral Drug Candidates,* [abstract] In World Congress, 2007.

**REIVINDICACIONES**

1. Péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de entre SEC ID nº 2 a SEC ID nº 4, para la utilización en el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa.  
5
2. Composición farmacéutica en dosis unitaria que comprende un péptido agonista de los receptores de la guanilato ciclase que presenta la secuencia de cualquiera de entre nº 2 a nº 4 presente en una cantidad terapéuticamente eficaz y un portador, excipiente o diluyente farmacéutico para la utilización en el tratamiento o la prevención de la colitis ulcerosa.  
10
3. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 2, en la que la forma de dosis unitaria se selecciona de entre el grupo que consiste de una tableta, una cápsula, una solución o una formulación para inhalación.  
15
4. Péptido o composición para la utilización según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho tratamiento o prevención comprende además administrar una dosis eficaz de inhibidor de una fosfodiesterasa específica de GMPC.  
20
5. Péptido o composición para la utilización según la reivindicación 4, en el que dicho tratamiento o prevención comprende además administrar una dosis eficaz de un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPC concurrente o secuencialmente con dicho agonista de receptores de la guanilato ciclase.
6. Péptido o composición para la utilización según la reivindicación 4 ó 5, en el que dicho inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPC se selecciona de entre el grupo que consiste de suldinac sulfona, zaprinast y motapizona, vardenafil y sildenafil.