

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 866**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2014** **PCT/US2014/041143**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014** **WO14197720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2014** **E 14735048 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 3004138**

54 Título: **Agonistas ultrapuros de guanilato ciclasa C, método de elaboración y uso de los mismos**

30 Prioridad:

05.06.2013 US 201361831402 P

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

10.10.2024

73 Titular/es:

BAUSCH HEALTH IRELAND LIMITED (100.0%)
3013 Lake Drive, Citywest Business Campus
Dublin 24, IE

72 Inventor/es:

SHAILUBHAI, KUNWAR;
COMISKEY, STEPHEN;
FENG, RONG;
BAI, JUNCAI;
ZHANG, RUOPING;
JIA, JUN;
ZHOU, JUNFENG;
ZHAO, QIAO y
ZHANG, GUOQING

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 981 866 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agonistas ultrapuros de guanilato ciclasa C, método de elaboración y uso de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procesos para purificar agonistas peptídicos de guanilato ciclasa C útiles para preparar formulaciones para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades y trastornos.

10 Antecedentes de la invención

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

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

La señalización mediada por cGMP que se inicia mediante los péptidos de guanilina es crítica para el funcionamiento normal del intestino. Cualquier anomalía en este proceso podría provocar trastornos gastrointestinales tales como síndrome del intestino irritable (SII) y enfermedades inflamatorias del intestino. La enfermedad inflamatoria del intestino es un nombre general que se le da a un grupo de trastornos que causan que los intestinos se inflamen, caracterizándose por tejido enrojecido e inflamado. Los ejemplos incluyen colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria grave que afecta predominantemente al íleon y al colon, pero también puede aparecer en otras secciones del tubo gastrointestinal. La colitis ulcerosa es exclusivamente una enfermedad inflamatoria del colon, el intestino grueso. A diferencia de la enfermedad de Crohn, en la que están afectadas todas las capas del intestino y en la que puede haber intestino sano normal entre parches de intestino enfermo, la colitis ulcerosa afecta sólo el revestimiento más interno (mucosa) del colon de manera continua. Dependiendo de qué porción del tubo gastrointestinal esté implicada, la enfermedad de Crohn puede denominarse ileítis, enteritis regional, colitis, etc. La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se diferencian del colon espástico o del síndrome del intestino irritable, que son trastornos de la motilidad del tubo gastrointestinal. La inflamación gastrointestinal puede ser una afección crónica. Se estima que hasta 1.000.000 de estadounidenses padecen enfermedad inflamatoria del intestino, y los pacientes masculinos y femeninos parecen verse igualmente afectados. La mayoría de los casos se diagnostican antes de los 30 años, pero la enfermedad puede aparecer en la sexta, séptima y posteriores décadas de la vida.

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

Aunque no se conocen las causas precisas del SII y de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), una alteración en el proceso de renovación continua de la mucosa gastrointestinal puede contribuir a la patología de la enfermedad en la EII y agravar el SII. El proceso de renovación del revestimiento gastrointestinal es un proceso eficiente y dinámico que implica la proliferación y reposición continua de células dañadas no deseadas. Las tasas de proliferación de las células que recubren la mucosa gastrointestinal son muy altas, sólo superadas por el sistema hematopoyético. La homeostasis gastrointestinal depende tanto de la proliferación como de la muerte celular programada (apoptosis) de las células epiteliales que recubren la mucosa intestinal. Las células se pierden

continuamente desde las vellosidades hacia la luz del intestino y se reponen a un ritmo sustancialmente equivalente mediante la proliferación de células en las criptas, seguida de su movimiento ascendente hacia las vellosidades. Las tasas de proliferación celular y apoptosis en el epitelio intestinal se pueden aumentar o disminuir en diversas circunstancias, por ejemplo, en respuesta a estímulos fisiológicos tales como el envejecimiento, señales inflamatorias, hormonas, péptidos, factores de crecimiento, productos químicos y hábitos dietéticos. Además, una tasa de proliferación mejorada se asocia frecuentemente con una reducción en el tiempo de recambio y una expansión de la zona proliferativa. El índice de proliferación es mucho mayor en patologías tales la colitis ulcerosa y otros trastornos gastrointestinales. La hiperplasia intestinal es un importante promotor de la inflamación gastrointestinal. La apoptosis y la proliferación celular juntas regulan el número de células y determinan el índice de proliferación. Las tasas reducidas de apoptosis a menudo se asocian con un crecimiento anómalo, inflamación y transformación neoplásica. Por lo tanto, tanto el aumento de la proliferación como la reducción de la muerte celular pueden aumentar el índice de proliferación del tejido intestinal, lo que a su vez puede conducir a enfermedades inflamatorias gastrointestinales.

Además de la función de la uroguanilina y la guanilina como moduladores del líquido intestinal y la secreción de iones, estos péptidos también pueden participar en la renovación continua de la mucosa gastrointestinal manteniendo el equilibrio entre la proliferación y la apoptosis. Por ejemplo, los péptidos de uroguanilina y guanilina parecen promover la apoptosis al controlar el flujo de iones celulares. Dada la prevalencia de enfermedades inflamatorias en las sociedades occidentales, existe la necesidad de mejorar las opciones de tratamiento para las enfermedades inflamatorias, particularmente del tubo gastrointestinal.

Los agonistas peptídicos de los agonistas de guanilato ciclasa C ("agonistas de CCG") se describen en las Patentes de EE.UU. N.º 7.041.786, 7.799.897 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º US2009/0048175, US 2010/0069306, US 2010/0120694, US 2010/0093635 y US 2010/0221329, y el documento WO2012/118972. Sin embargo, las síntesis anteriores de péptidos para aplicación farmacéutica presentan una serie de problemas especiales tales como un bajo rendimiento general (por ejemplo, inferior al 10 %) y/o altos niveles de impurezas (por ejemplo, contaminantes resultantes de disolventes orgánicos usados durante las síntesis o la purificación y productos de degradación o topoisómeros creados, por ejemplo, durante la purificación).

Sumario de la invención

Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o métodos de diagnóstico *in vivo* en esta descripción no describen parte de la invención reivindicada. La invención es como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la presente invención se obtiene a partir del esfuerzo por resolver diversos problemas inesperados encontrados durante los procesos de purificación de agonistas peptídicos de GCC para aplicación farmacéutica, tales como el proceso de liofilización y el proceso de precipitación descritos en el documento WO2012/118972. Los métodos descritos en el presente documento proporcionan una solución a esos problemas.

En un primer aspecto, la invención proporciona un proceso para purificar un péptido sintético que comprende la secuencia agonista de guanilato ciclasa C seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-54 y 56-251, comprendiendo el proceso:

proporcionar una primera solución peptídica que comprende un péptido que comprende la secuencia agonista de GCC seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-54 y 56-251, agua y acetnitrilo;
cargar una columna adsorbente polimérica o RP-HPLC Cis con la primera solución peptídica para adsorber el péptido en la columna adsorbente polimérica,
eluir el péptido de la columna adsorbente polimérica o RP-HPLC Cis con una solución de isopropanol/agua para formar una segunda solución peptídica,
someter la segunda solución peptídica a evaporación rotatoria para eliminar el exceso de isopropanol,
liofilizar la segunda solución peptídica de manera que se obtenga un péptido seco,
reconstituir el péptido seco en un tampón que contiene acetato de amonio para formar una tercera solución peptídica, y
liofilizar la tercera solución peptídica de manera que se obtenga un péptido seco purificado.

El proceso puede incluir una o más de las siguientes características.

En otra realización de la divulgación, la solución acuosa de alcohol comprende propanol, *terc*-butanol, 2-butanol o etanol.

Por ejemplo, la primera solución peptídica comprende además acetamida.

Por ejemplo, la primera solución peptídica comprende además ácido acético (por ejemplo, 0,2 %) o fosfato de trietilamina (por ejemplo, 1 %).

Por ejemplo, la cantidad de isopropanol en la segunda solución peptídica se reduce, por ejemplo, por evaporación

rotatoria a menos del 5 %.

Por ejemplo, el péptido en la primera solución peptídica se prepara mediante el proceso de condensación de fragmentos (es decir, un proceso híbrido en fase de solución y fase sólida) como se describe en el documento WO2012/118972. En una realización, la primera solución peptídica se obtiene a partir de una etapa de intercambio de sal en la que el péptido se lava con una solución acuosa de acetonitrilo que comprende fosfato de trietilamina o ácido acético.

Por ejemplo, la columna adsorbente polimérica es una columna de RP-HPLC C₁₈ preparativa. En una realización, la columna adsorbente polimérica comprende una resina de poliestireno. En particular, la resina se selecciona de manera que el péptido purificado eluido o desorbido no sea inferior al 80 % de la cantidad de péptido adsorbido en la resina, por ejemplo, no inferior al 85 %, no inferior al 90 % o no inferior al 95 %. En una realización, la resina está formada por poliestireno reticulado con un diámetro de poro promedio superior a 5 nm, por ejemplo, aproximadamente 6-8 nm, 10-15 nm, 15-20 nm o 25-30 nm.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un péptido purificado que comprende la secuencia agonista de guanilato ciclasa C seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 9 y 104, en donde el péptido purificado tiene las siguientes características:

- a) tiene una densidad aparente no superior a 0,1 g/ml;
- b) contiene menos de 50 ppm de acetamida;
- c) menos del 0,3 % de alfa-Asp-9-plenacatanida
- d) menos del 0,05 % de ácido trifluoroacético (TFA).

El péptido purificado puede tener una o más de las siguientes características.

Por ejemplo, el péptido es estable a 25 °C durante al menos tres meses.

Por ejemplo, el péptido tiene una distribución del tamaño de partícula que tiene un valor D10 de entre aproximadamente 2 y 15 µm; un valor D50 de entre aproximadamente 15-50 µm; y un valor D90 de entre aproximadamente 40-80 µm cuando se mide mediante dispersión de luz con dispersante líquido.

Por ejemplo, el péptido purificado no contiene más de 35 ppm de acetamida (por ejemplo, ≤18 ppm).

Por ejemplo, el péptido purificado contiene menos del 0,15 % de alfa-Asp-9-plenacatanida (que tiene un tiempo de retención relativo (RRT, por sus siglas en inglés) de -1,33 según el análisis por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) descrito en el presente documento).

Por ejemplo, el péptido purificado tiene una densidad aparente no superior a 0,09 g/ml, no superior a 0,08 g/ml, no superior a 0,07 g/ml, no superior a 0,06 g/ml, no superior a 0,05 g/ml, no superior a 0,04 g/ml o no superior a 0,03 g/ml.

Por ejemplo, el péptido purificado está sustancialmente libre de agua (por ejemplo, contenido de agua que no excede el 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3,5 %, 3 %, 2,5 %, 2 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 % o el 0,1 %, del peso total del péptido).

Por ejemplo, el péptido purificado tiene una pureza cromatográfica no inferior al 95 %, no inferior al 96 % o no inferior al 97 %.

Por ejemplo, el contenido total de impurezas en el péptido purificado es inferior al 3 % (por ejemplo, <2 % o <1 %).

Por ejemplo, el péptido purificado está además sustancialmente libre de una o más impurezas seleccionadas de acetonitrilo, alcoholes, amonio, acetatos y TFA.

Por ejemplo, el péptido purificado contiene menos de 300 ppm de acetonitrilo (por ejemplo, <250 ppm).

Por ejemplo, el péptido purificado contiene menos del 0,2 % de TFA (por ejemplo, <0,15 %, <0,1 %, <400 ppm, <300 ppm, <200 ppm, <100 ppm o <50 ppm).

Por ejemplo, el péptido purificado contiene menos del 0,2 % de isopropanol, es decir, IPA (por ejemplo, <0,15 %, <0,1 %, <1000 ppm, <900 ppm, <800 ppm, <700 ppm, <600 ppm, <500 ppm, <400 ppm, <300 ppm, <200 ppm, <100 ppm, <50 ppm o <20 ppm).

Por ejemplo, el péptido purificado contiene menos del 0,25 % de acetato (por ejemplo, <0,2 % o <0,1 %).

Por ejemplo, el péptido purificado está sustancialmente libre de topoisómeros (por ejemplo, <0,4 %, <0,3 %, <0,2 % o <0,1 %).

Por ejemplo, el péptido purificado está sustancialmente libre de iso-Asp2-plecanatida (RRT 0,96-0,97) (por ejemplo, <0,4 %, <0,3 %, <0,2 % o <0,1 %).

- 5 En otro aspecto más, la divulgación también proporciona un péptido purificado preparado mediante el proceso de purificación de la invención. Los péptidos purificados pueden tener una o más de las siguientes características.

Por ejemplo, el péptido purificado comprende la secuencia agonista de GCC seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 9 y 104.

- 10 Por ejemplo, el péptido purificado tiene una pureza cromatográfica no inferior al 96 %, no inferior al 97 % o no inferior al 98 %. Por ejemplo, el péptido agonista de GCC tiene un contenido de impurezas cromatográficas no superior al 4 %, no superior al 3,5 %, no superior al 3 %, no superior al 2,5 %, no superior al 2 %, no superior al 1,5 % o no superior al 1 %. El contenido de impurezas cromatográficas se determina como porcentajes de área total de impurezas
15 mediante HPLC. El contenido de impurezas cromatográficas incluye el contenido de topoisómeros. Las impurezas no incluyen ningún excipiente farmacéuticamente aceptable usado para la formulación de fármacos.

- Por ejemplo, el péptido purificado está sustancialmente libre de contaminantes resultantes del proceso de preparación de péptidos tales como disolventes orgánicos usados en el proceso, por ejemplo, amonio, acetonitrilo, acetamida, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol o isopropanol), TFA, éter u otros contaminantes. En este contexto, "sustancialmente" libre de contaminantes significa que el contenido de contaminantes del péptido al final del proceso de purificación es preferentemente inferior al 0,5 %, inferior al 0,3 %, inferior al 0,25 %, inferior al 0,1 %, inferior al 0,05 %, inferior al 0,04 %, inferior al 0,03 %, inferior al 0,02 %, inferior al 0,01 %, inferior al 0,005 %, inferior al 0,003 %, o inferior al 0,001 % del peso total del péptido. Por ejemplo, el péptido purificado contiene <50 ppm de acetamida (por ejemplo, ≤35 ppm o ≤18 ppm), <300 ppm de acetonitrilo (por ejemplo, <250 ppm), <1000 ppm de TFA (por ejemplo, <400 ppm, <300 ppm, <200 ppm, <100 ppm o <50 ppm), <2000 ppm de isopropanol (por ejemplo, <1500 ppm, <1000 ppm, <500 ppm, <400 ppm, <300 ppm, <200 ppm, <100 ppm, <50 ppm o <20 ppm), y/o <0,25 % de acetato (por ejemplo, <0,2 % o <0,1 %). El contenido de contaminantes se puede determinar mediante métodos convencionales tales como cromatografía de gases. Preferentemente, los disolventes residuales en el péptido purificado de la invención son inferiores a los límites establecidos en las directrices de la ICH, por ejemplo, IMPURITIES: GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS Q3C(R5) (disponible en http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Step4/Q_3C_R5_Step4.pdf).

- 35 Por ejemplo, el péptido purificado contiene menos del 0,3 % (por ejemplo, <0,15 %) de alfa-Asp-9-plecanatida (RRT 1,33).

Por ejemplo, el péptido purificado tiene una densidad aparente no superior a 0,09 g/ml, no superior a 0,08 g/ml, no superior a 0,07 g/ml, no superior a 0,06 g/ml, no superior a 0,05 g/ml, no superior a 0,04 g/ml o no superior a 0,03 g/ml.

- 40 Por ejemplo, el péptido purificado está sustancialmente libre de iso-Asp2-plecanatida (RRT ~0,96-0,97). En este contexto "sustancialmente" libre de iso-Asp2-plecanatida significa que el contenido de iso-Asp2-plecanatida del péptido al final del proceso de purificación es preferentemente inferior al 2 %, inferior al 1,5 %, inferior al 1,25 %, inferior al 1 %, inferior al 0,9 %, inferior al 0,8 %, inferior al 0,7 %, inferior al 0,6 %, inferior al 0,5 %, inferior al 0,4 %, inferior al 0,3 %, inferior al 0,2 % o inferior al 0,1 %, del peso total del péptido.

- 45 Por ejemplo, el péptido purificado está sustancialmente libre de topoisómeros. En este contexto, "sustancialmente" libre de topoisómeros significa que el contenido de topoisómeros del péptido al final del proceso de purificación es preferentemente inferior al 2 %, inferior al 1,5 %, inferior al 1,25 %, inferior al 1 %, inferior al 0,9 %, inferior al 0,8 %, inferior al 0,7 %, inferior al 0,6 %, inferior al 0,5 %, inferior al 0,4 %, inferior al 0,3 %, inferior al 0,2 % o inferior al 0,1 %, del peso total del péptido.

- 50 Por ejemplo, el péptido purificado está sustancialmente libre de agua. En este contexto, "sustancialmente" libre de agua significa que el contenido de agua del péptido al final del proceso de purificación es preferentemente inferior al 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, inferior al 6 %, inferior al 5 %, inferior al 4,5 %, inferior al 4,25 %, inferior al 4 %, inferior al 3,5 %, inferior al 3 %, inferior al 2,5 %, inferior al 2 %, inferior al 1,5 %, inferior al 1 %, inferior al 0,5 %, inferior al 0,25 % o inferior al 0,1 %, del peso total del péptido.

- 60 Por ejemplo, el péptido tiene una distribución del tamaño de partícula que tiene un valor D10 de entre aproximadamente 2 y 15 µm; un valor D50 de entre aproximadamente 15-50 µm; y un valor D90 de entre aproximadamente 40-80 µm cuando se mide mediante dispersión de luz con dispersante líquido.

- 65 Por ejemplo, el péptido purificado tiene una distribución del tamaño de partícula caracterizada por un valor D50 de aproximadamente 600 µm cuando se mide mediante dispersión de luz con dispersante de aire. En comparación, los péptidos purificados a partir de los procesos de liofilización y precipitación descritos en el documento WO2012/118972 tienen valores D50 de aproximadamente 180-250 µm y aproximadamente 300 µm, respectivamente.

Por ejemplo, el péptido purificado preparado mediante los procesos de la invención tiene una distribución de tamaño adecuada para la formulación farmacéutica. En una realización, el péptido (por ejemplo, SP-304) tiene una distribución de tamaño (por ejemplo, un tamaño promedio de 80-120 μm) comparable a la del excipiente farmacéutico (por ejemplo, celulosa microcristalina) usado en la formulación, por ejemplo, en forma de dosis unitaria de 3 mg/día. La distribución de tamaño del péptido purificado puede variar basándose en la dosis unitaria. Por ejemplo, cuando la dosis unitaria es inferior a 3 mg/día, el péptido purificado en la formulación farmacéutica tiene un tamaño promedio menor que el de la dosis de 3 mg/día. Por ejemplo, el péptido purificado preparado mediante los procesos de la invención se muele para alcanzar la distribución de tamaño adecuada.

La distribución de tamaño del péptido de la invención se puede determinar mediante métodos tradicionales, tales como análisis de tamiz, oscurecimiento de la luz o análisis de dispersión dinámica de la luz.

La divulgación también se refiere a una formulación (por ejemplo, una formulación oral) que contiene los péptidos preparados y/o purificados mediante los métodos descritos en el presente documento y, en particular, una formulación de dosis baja que contiene 0,05-10 mg (por ejemplo, 0,1 mg, 0,3 mg o 0,5 mg) de los péptidos purificados. La formulación de dosis baja puede tener además una o más características adicionales como se describe en los documentos WO2012/037380 y US 2012-0237593 y puede prepararse mediante los métodos divulgados en los mismos, como la mezcla en seco.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

La figura 4 es un cromatograma UPLC de plecanatida aislada mediante una realización del proceso de purificación de la invención.

Descripción detallada

En un aspecto, la presente invención proporciona una solución a diversos problemas inesperados encontrados durante los procesos de purificación de agonistas peptídicos de GCC para aplicación farmacéutica, tales como el proceso de liofilización y el proceso de precipitación descritos en el documento WO2012/118972.

En particular, se encontró que el proceso de liofilización descrito en el documento WO2012/118972, que implicaba el uso de disolvente de acetonitrilo/agua, dio como resultado inesperadamente un enriquecimiento de acetamida residual (una impureza a nivel de trazas en el acetonitrilo) en el producto de plecanatida liofilizado con alto contenido de acetamida (es decir, que variaba de 88 a 453 ppm entre los lotes analizados, o aproximadamente 300 ppm en promedio), lo que dificultó la comercialización de plecanatida con dosis superiores a 3 mg/día. Además, el producto de plecanatida liofilizado también tenía una alta variabilidad de niveles de sales residuales tales como TFA, acetato y sales de amonio.

Por otro lado, mientras que el producto de plecanatida purificado mediante el proceso de precipitación descrito en el documento WO2012/118972 tenía un bajo contenido de acetamida residual (<50 ppm) y una mayor densidad aparente o de compactación (es decir, aproximadamente diez veces mayor) que el producto liofilizado, el producto de plecanatida precipitado contenía altos niveles de disolventes residuales (por ejemplo, IPA de hasta 90.000 ppm) debido a la dificultad para eliminar los disolventes usados para la precipitación de péptidos. Además, si bien el calentamiento a baja temperatura (45 °C) durante el secado al vacío ayudó a reducir el isopropanol residual a una cantidad por debajo del límite ICH de 5000 ppm (por ejemplo, 1700 ppm), un degradador térmico, alfa-Asp-9-plecanatida, que tenía un tiempo de retención relativo (RRT) de -1,33 según el análisis de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), se formó a continuación en el producto peptídico final en una concentración de hasta el 0,9 %. El contenido de la impureza de RRT 1,33 también aumenta en la plecanatida y comprimidos de la misma durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Por lo tanto, el alto nivel inicial de esta impureza de RRT 1,33 en la plecanatida producida por el proceso de precipitación da como resultado una ventana de aceptación más pequeña y, por lo tanto, acorta la vida útil de los productos farmacéuticos de plecanatida.

Los procesos de purificación de la invención resuelven el problema del disolvente residual y el problema de degradación, por ejemplo, intercambiando el disolvente de acetonitrilo/agua con disolvente de IPA/agua seguido de evaporación rotatoria para reducir el IPA a un nivel bajo crítico (por ejemplo, <5 %), seguido de una primera liofilización del sublote, lo que dio como resultado niveles bajos pero inaceptables de disolventes residuales, seguido a continuación de una reconstitución en agua y una liofilización final que dio como resultado niveles bajos y aceptables de disolventes residuales para aplicación farmacéutica. Además, los procesos de purificación de la invención son adecuados para aumentar la preparación/purificación de péptidos.

Además, se descubrió inesperadamente que añadir una pequeña cantidad de tampón de acetato de amonio (por ejemplo, 0,5 % al péptido seco) durante la reconstitución con agua (pH 5) antes de la liofilización final mejora la solubilidad del producto final. Además, el tampón de acetato de amonio (pH 5) reduce la tasa de topoisomerización de plecanatida en solución durante la liofilización. El tampón de acetato de amonio (pH 5) también controla los niveles de sal residual en el producto final con menor variabilidad en comparación con el producto de liofilización descrito en el documento WO2012/118972.

El péptido al final de los procesos de purificación o aislamiento de la invención tiene un nivel de acetamida residual bajo (<50 ppm) y una densidad aparente no superior a 0,1 g/ml, así como un nivel global más bajo de disolventes residuales (por ejemplo, <500 ppm de IPA, <300 ppm de ACN), bajos niveles de impurezas de degradación (por ejemplo, <0,1 % de degradador de alfa-Asp-9-plecanatida (RRT 1,33)) y topoisómeros (por ejemplo, 0,4 % o menos), y bajos niveles de sales residuales (por ejemplo, <0,1 % de TFA, 0,08-0,23 % de acetato y 0,11-0,17 % de amonio). La comparación entre productos de plecanatida aislados mediante diferentes métodos se presenta en la Tabla XX a continuación.

La invención proporciona procesos para purificar o aislar péptidos, por ejemplo, agonistas peptídicos de GCC, en particular péptidos preparados mediante un proceso híbrido en fase de solución y sólida, por ejemplo, como se describe en el documento WO2012/118972. El proceso híbrido incluye proporcionar dos o más fragmentos de un péptido de interés mediante síntesis en fase sólida y/o en fase de solución y acoplarlos mediante una síntesis en fase de solución para obtener el péptido objetivo. El proceso puede incluir además, si es necesario, ciclación oxidativa de residuos de aminoácidos de cisteína de un péptido lineal formado por el acoplamiento de fragmentos para producir un péptido ciclado.

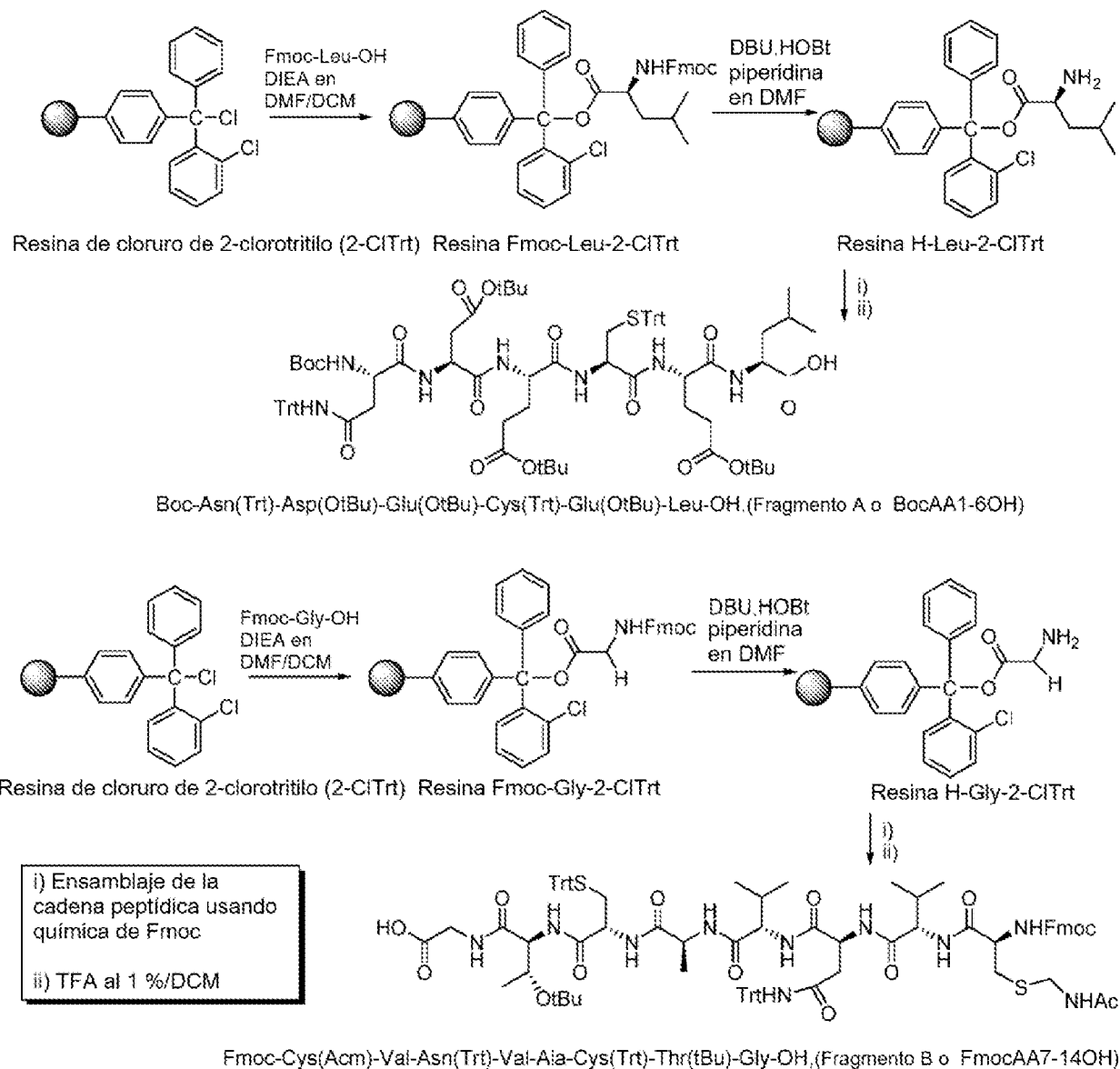
Los fragmentos descritos anteriormente se pueden preparar mediante síntesis peptídica en fase de solución estándar o técnicas de síntesis peptídica en fase sólida en las que se produce un enlace peptídico a través de la condensación directa del grupo amino (es decir, NH₂) de un primer aminoácido con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

La síntesis de enlaces peptídicos mediante condensación directa, como se ha formulado anteriormente, requiere la supresión del carácter reactivo del grupo amino del primer y del grupo carboxilo del segundo aminoácido. Los sustituyentes enmascarantes (es decir, grupos protectores) deben permitir su fácil eliminación, sin inducir la degradación de la molécula peptídica lábil. La expresión "péptido protegido" o "fragmento peptídico protegido" se refiere a un péptido o fragmento peptídico, en el que todos los grupos reactivos de sus aminoácidos constituyentes están enmascarados por grupos protectores, a menos que se especifique lo contrario. La expresión "péptido desprotegido" o "fragmento peptídico desprotegido" se refiere a un péptido o fragmento peptídico, en el que todos los grupos reactivos de sus aminoácidos constituyentes están libres de estar enmascarados por grupos protectores, a menos que se especifique lo contrario. La expresión "grupos reactivos" se refiere a los grupos que forman el enlace peptídico y aquellos que interfieren con la formación del enlace peptídico, tales como los grupos amino, carboxilo, hidroxilo y tiol (como en la cisteína). Los ejemplos de grupos protectores para amino incluyen, pero sin limitación, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), *terc*-butoxicarbonilo (Boc), benzoílo (Bz), acetilo (Ac) y bencilo (Bn). Los ejemplos de grupos protectores para carboxilo incluyen tritilo (trifenilmetilo, Trt) y *O-terc*-butilo (OtBu). Los ejemplos de grupos protectores para tiol incluyen acetamidometilo (Acm), *terc*-butilo (tBu), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (NPYS), 2-piridinasulfenilo (Pyr) y tritilo (Trt). Se describen ejemplos adicionales de grupos protectores en Greene, T.W., Wuts, P.G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, John Wiley & Sons: Nueva York, 1999.

Por ejemplo, se han usado métodos sintéticos híbridos para preparar SP-304 (plecanatida). En particular, se preparan tres fragmentos peptídicos, A, B y C y a continuación se ensambla una secuencia peptídica lineal mediante la condensación de los fragmentos A, B y C de la siguiente manera: Preparación del fragmento A, Boc-Asn(Trt)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Cys(Trt)-Glu(OtBu)-Leu-OH, mediante fase sólida a partir de resina de cloruro de 2-cloro-tritilo; preparación del fragmento B, Fmoc-Cys(Acm)-Val-Asn-Val-Ala-Cys(Trt)-Thr(tBu)-Gly-OH, mediante fase sólida a partir de resina de cloruro de 2-clorotritilo; preparación del fragmento C, Cys(Acm)-Leu-OtBu, mediante síntesis en fase de solución, acoplamiento de los fragmentos B y C en fase de solución para producir el fragmento B-C, y acoplamiento de los fragmentos A y B-C para producir el péptido lineal A-B-C.

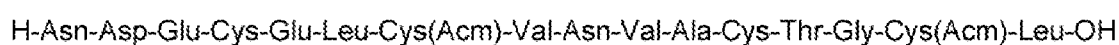
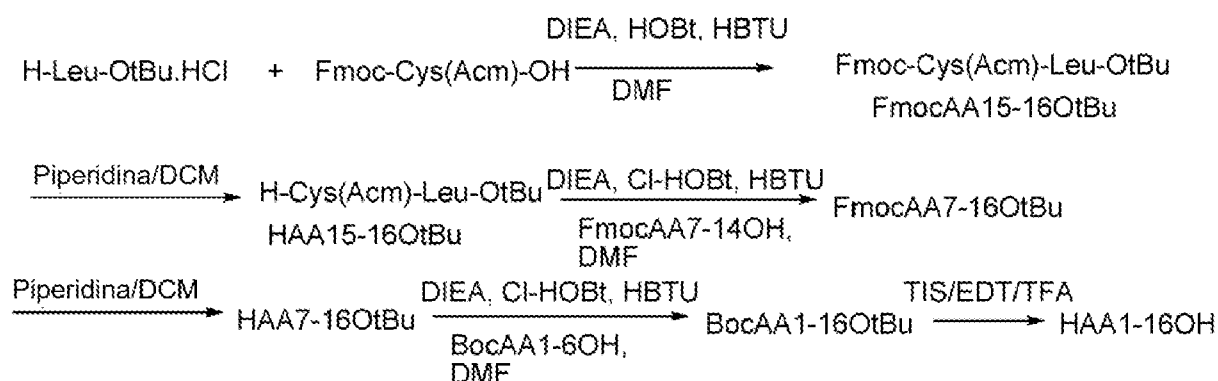
Los fragmentos A (BocAA1-6OH) y B (FmocAA7-14OH) protegidos con cadena lateral se pueden preparar mediante Fmoc SPPS usando la resina de cloruro de 2-clorotritilo (2-ClTrt) sensible a los superácidos y derivados de aminoácidos protegidos con Fmoc, como se muestra en el Esquema 1 a continuación.

Esquema 1



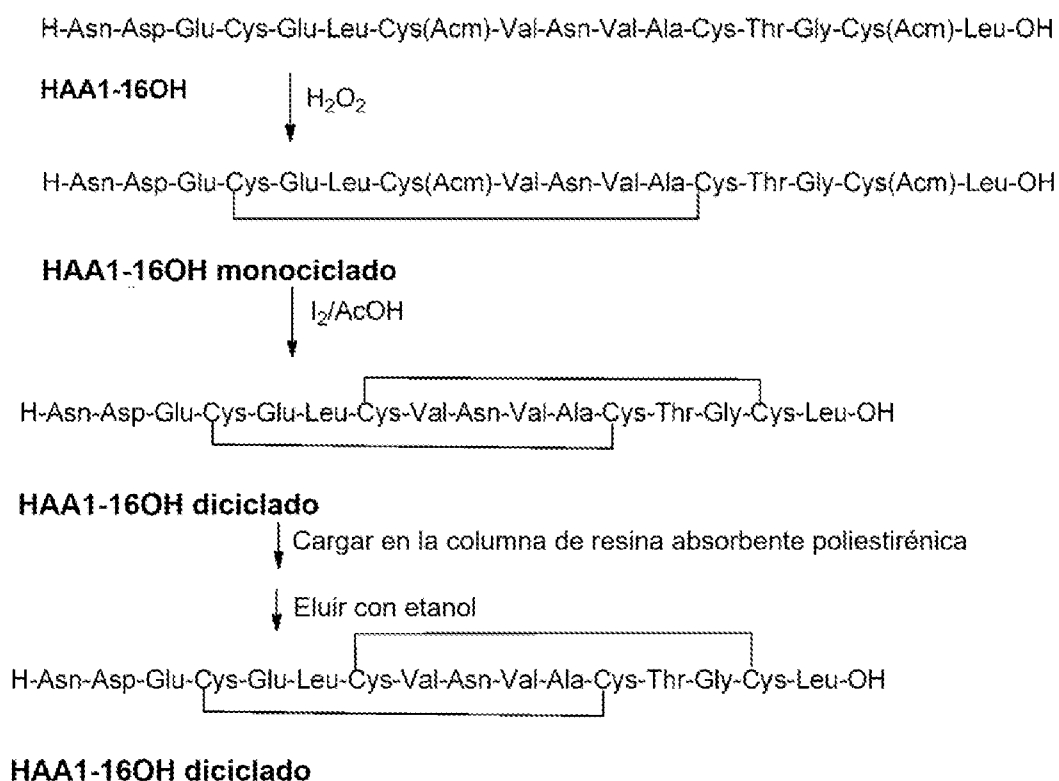
- 5 El fragmento C (HAA15-16OtBu) se puede preparar mediante la síntesis en fase de solución y a continuación se puede acoplar al fragmento B (FmocAA7-14OH) en fase de solución para dar el fragmento B-C (FmocAA7-16OtBu). A continuación, el grupo protector Fmoc se puede eliminar del fragmento B-C (FmocAA7-16OtBu)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

Esquema 2

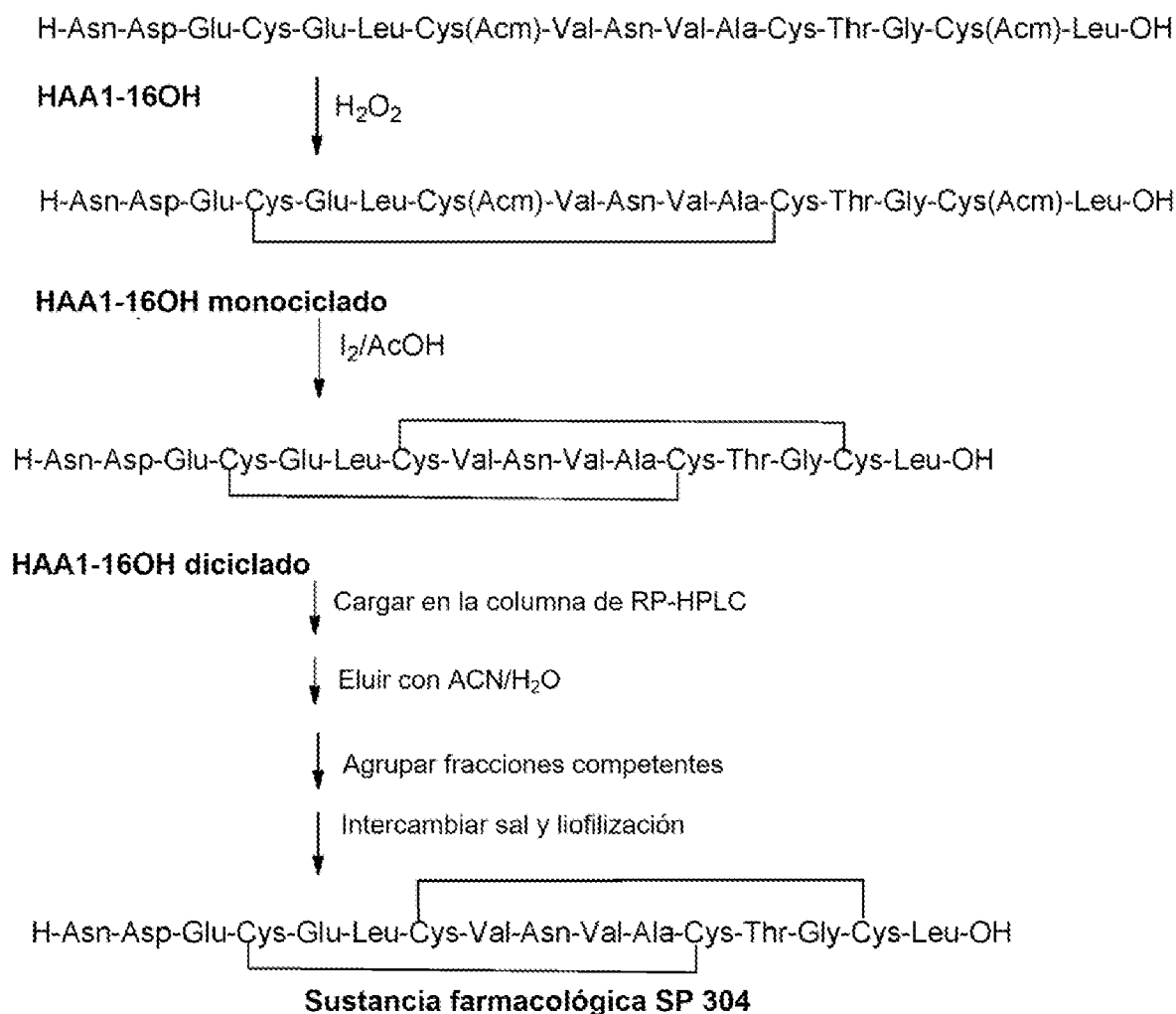


- 5 El SP-304 lineal protegido con cadena lateral (BocAA1-16OtBu) se puede tratar con ácido trifluoroacético/triisopropilsilano/etanoditiol (TFA/TIS/EDT) para dar el SP-304 parcialmente protegido (HAA1-16OH) en el que los 2 grupos S-Acm (como se muestra en el Esquema 2 anterior) están intactos. El SP-304 lineal parcialmente protegido (HAA1-16OH) puede oxidarse con H₂O₂, seguido de la eliminación simultánea de los grupos S-Acm y la formación de disulfuro con yodo para dar SP-304 dicíclico en bruto, como se muestra en los Esquemas 3 y 4 a continuación.
- 10

Esquema 3



Esquema 4



A continuación, la solución de SP-304 dicíclico en bruto se puede purificar y concentrar, como se muestra en el Esquema 3 anterior, cargando la solución en una resina adsorbente poliestirénica (por ejemplo, columna D101 (Anhui Sanxing (China); poliestireno reticulado; área superficial 500-550 m²/g; diámetro de poro promedio: 9-10 nm; volumen de poro: 1,18-1,24 ml/g; densidad aparente: 0,65-0,70 g/ml; densidad específica: 1,03-1,07 g/ml; humedad: 67-75 %; tamaño de partícula: 0,315-1,25 mm 95 %; diámetro efectivo: 0,4-0,7 mm; coeficiente de uniformidad: ≤1,6 %), DA201C, DA201H, ADS-8 y ADS-5), eluyendo el SP-304 dicíclico de la columna con un eluyente (por ejemplo, una solución acuosa de etanol al 90 %), concentrando la solución de SP-304 recogida a presión reducida y precipitando SP-304 con metil t-butil éter (MTBE). A continuación, el precipitado se puede recoger mediante filtración o centrifugación y secar a alto vacío para dar SP-304 en forma sólida.

Como se ilustra en el Esquema 4 anterior, la solución de SP-304 dicíclico en bruto también se puede purificar directamente en una columna HPLC C18 preparativa con acetonitrilo (ACN), metanol y/o agua en diversos sistemas tampón. El SP-304 dicíclico en bruto también se puede purificar mediante otros métodos conocidos por un experto en la técnica.

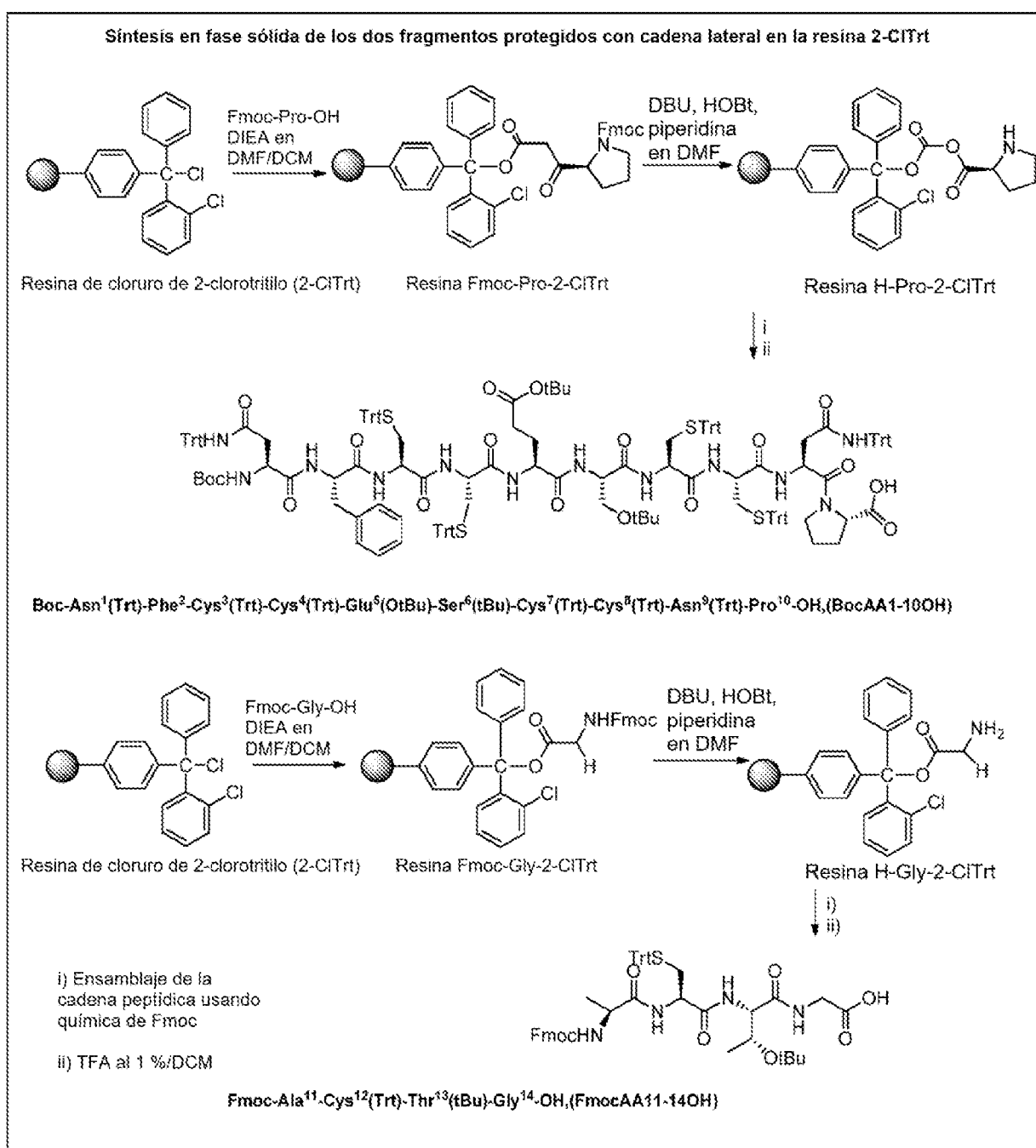
Los expertos en la técnica reconocerán que, en la síntesis en fase sólida, las reacciones de desprotección y acoplamiento deben completarse y los grupos bloqueantes de las cadenas laterales deben ser estables durante toda la síntesis.

La acetilación del extremo N se puede lograr haciendo reaccionar el péptido final con anhídrido acético antes de la escisión de la resina. La C-amidación se logra usando una resina apropiada tal como resina de metilbencidrilamina usando la tecnología Boc.

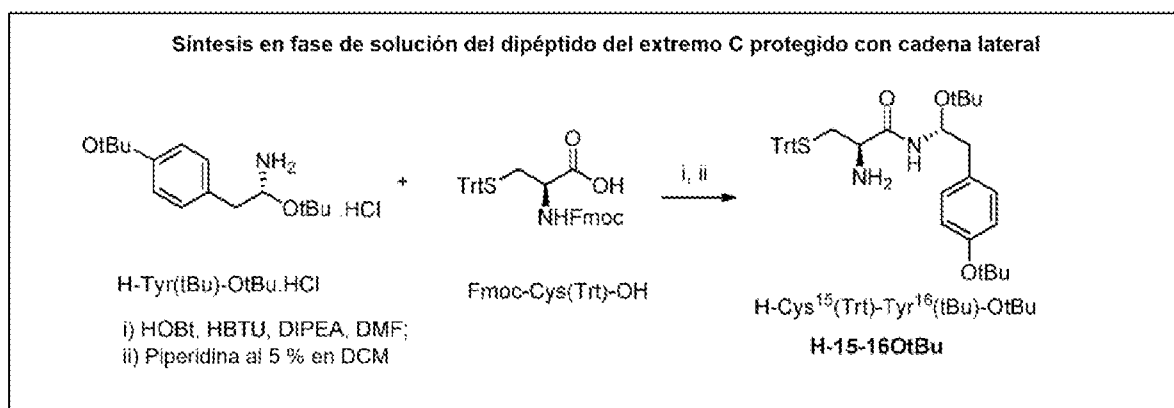
En la síntesis en fase de solución, se puede usar una amplia diversidad de métodos de acoplamiento y grupos protectores (véanse, Gross y Meienhofer, eds., "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 1-4 (Academic Press,

- 1979); Bodansky y Bodansky, "The Practice of Peptide Synthesis", 2ª ed. (Springer Verlag, 1994)). Además, es posible una purificación intermedia y un aumento lineal. Los expertos en la técnica apreciarán que la síntesis en solución requiere la consideración de los grupos protectores de la cadena principal y de la cadena lateral y el método de activación. Además, es necesaria una cuidadosa selección de fragmentos para minimizar la racemización durante la condensación de los fragmentos. Por ejemplo, la racemización se minimiza cuando los fragmentos contienen Gly o Pro en el extremo C. Las consideraciones de solubilidad también son un factor. La síntesis peptídica en fase sólida usa un polímero insoluble como soporte durante la síntesis orgánica. La cadena peptídica soportada por polímero permite el uso de etapas sencillas de lavado y filtración en lugar de laboriosas purificaciones en etapas intermedias. Generalmente, la síntesis peptídica en fase sólida se puede realizar de acuerdo con el método de Merrifield *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85:2149, que implica ensamblar una cadena peptídica lineal sobre un soporte de resina usando aminoácidos protegidos. La síntesis peptídica en fase sólida típicamente utiliza la estrategia Boc o Fmoc, ambas bien conocidas en la técnica.
- La estrategia general para la síntesis híbrida de SP-353 incluye síntesis en fase sólida y en fase de solución para producir fragmentos peptídicos adecuados (véanse los Esquemas 5 y 6 a continuación), condensación de segmento posterior para formar el péptido en bruto lineal (véase el Esquema 7 a continuación) y plegamiento oxidativo natural para formar el producto final ciclado (véase el Esquema 7 a continuación). También se puede usar la misma estrategia para producir otros análogos del péptido ST (tales como SP-354, linaclotida, etc.) de secuencias de aminoácidos similares que se muestran en la Tabla II.

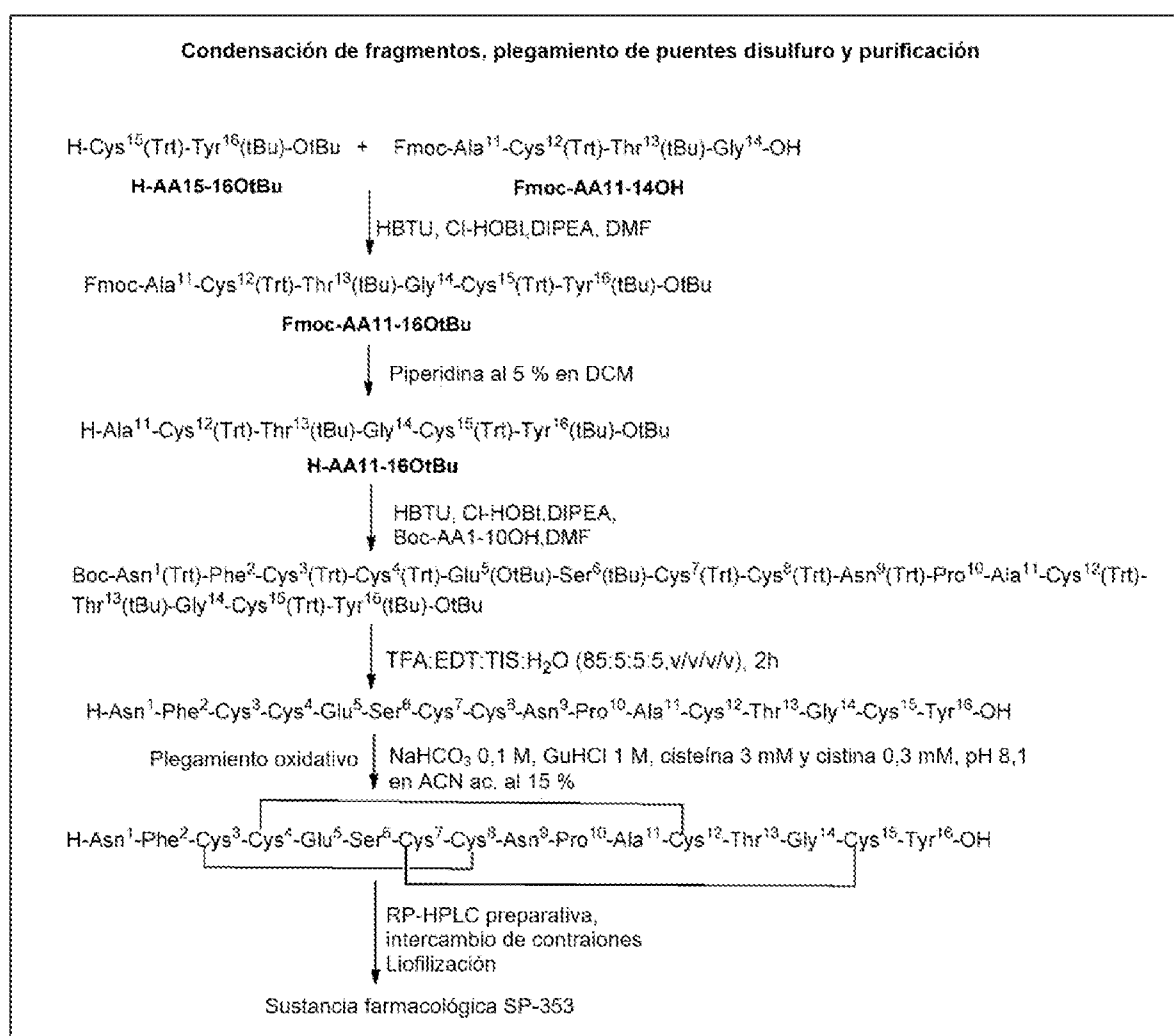
Esquema 5



Esquema 6

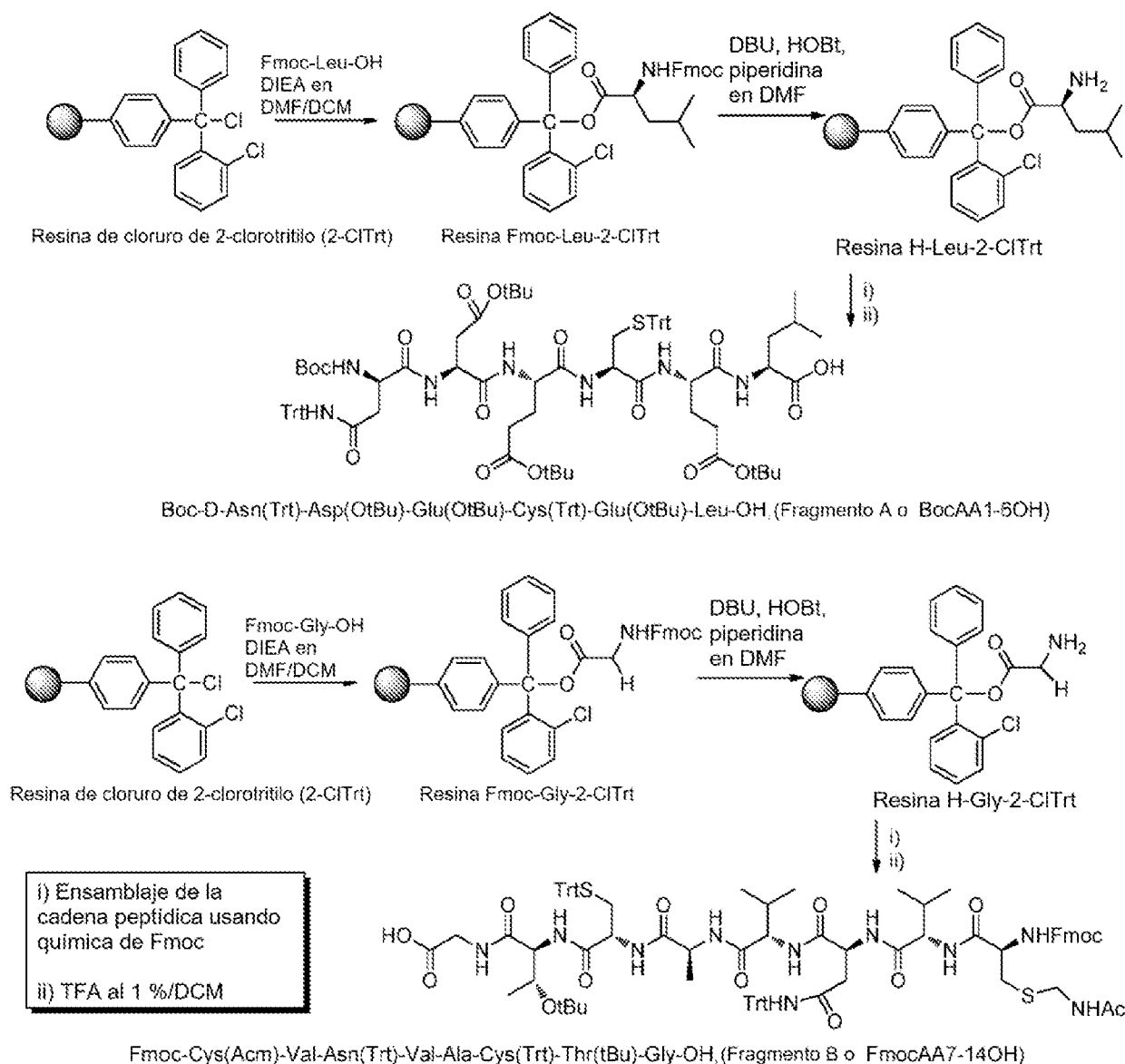


Esquema 7

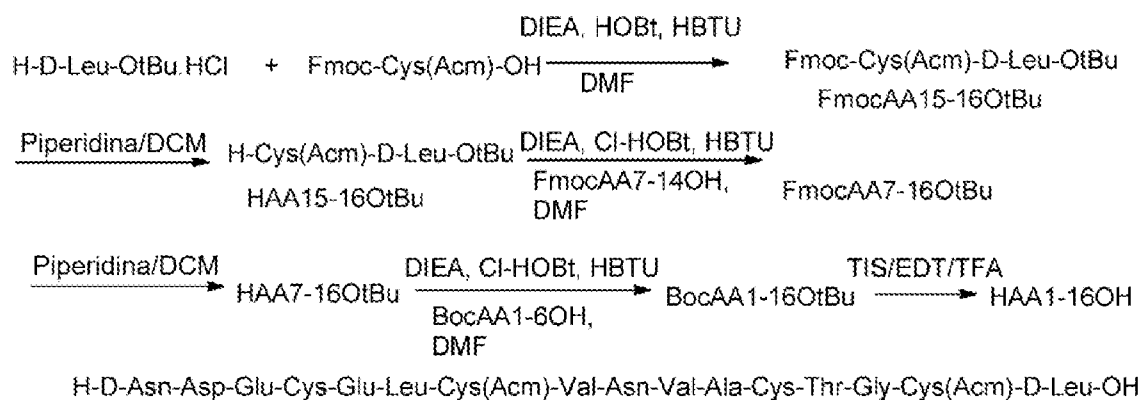


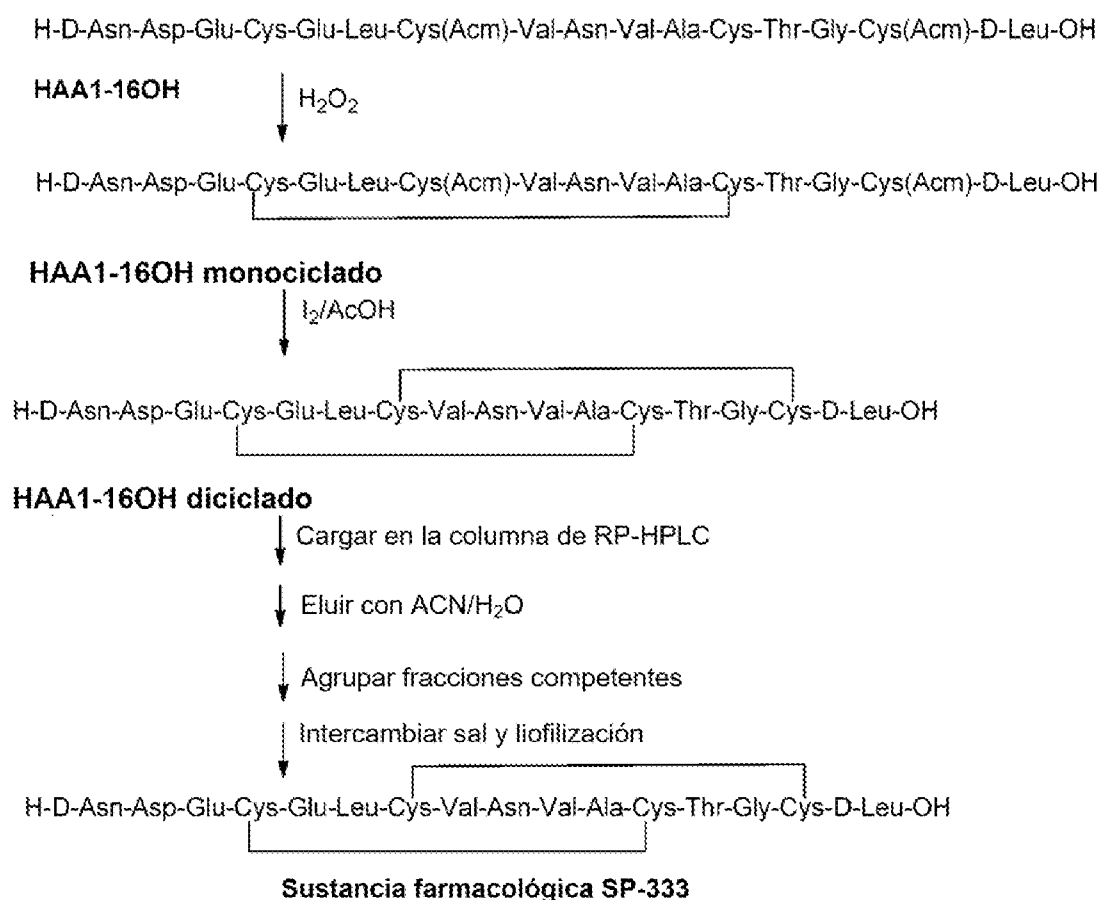
- 5 La estrategia general para la síntesis híbrida de SP-333 incluye síntesis en fase sólida y en fase de solución para producir fragmentos peptídicos adecuados (véanse los Esquemas 8 y 9 a continuación), condensación de segmento posterior para formar el péptido en bruto lineal (véase el Esquema 9 a continuación) y plegamiento oxidativo para formar el producto final ciclado, purificación y liofilización (véase el Esquema 10 a continuación).

Esquema 8

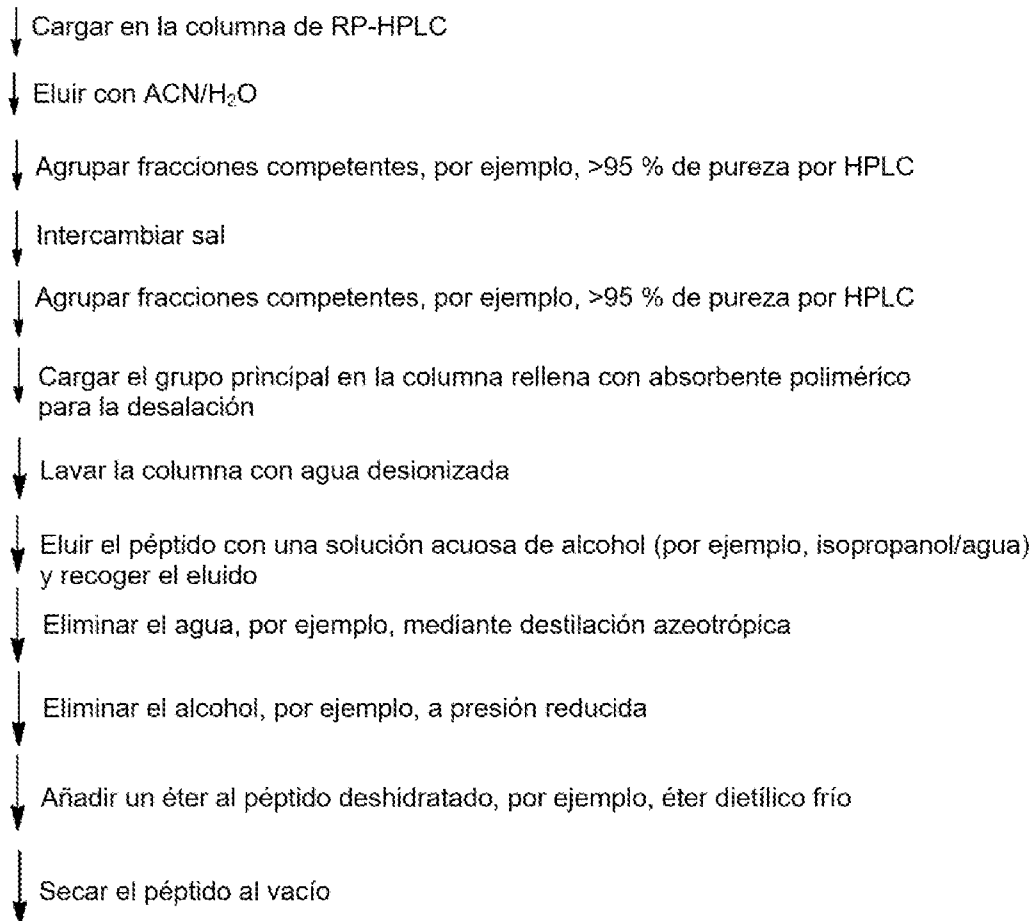


Esquema 9



Esquema 10

La estrategia general para purificar péptidos, incluidos los sintetizados mediante los métodos híbridos divulgados en el presente documento, incluye, por ejemplo, las etapas ilustradas en el Esquema 11 a continuación. Se entiende que determinadas etapas en el Esquema 11 pueden repetirse (por ejemplo, aclarar la columna con agua desionizada) o estar ausentes (por ejemplo, intercambio de sal o eliminación de alcohol después de la deshidratación) para optimizar el proceso de purificación.

Esquema 11**Péptido, por ejemplo, SP-304 o SP-333 diciclado****Péptido purificado para un proceso de fabricación de fármacos adicional**

- El proceso de precipitación, como se ilustra en el Esquema 11, proporciona un péptido purificado, por ejemplo, agonistas peptídicos de GCC. Preferentemente, el péptido purificado es SP-304 (SEQ ID NO: 1) o SP-333 (SEQ ID NO:9). En una realización, el SP-304 o SP-333 purificado tiene una densidad aparente no inferior a 0,05 g/ml, no inferior a 0,1 g/ml, no inferior a 0,2 g/ml, no inferior a 0,3 g/ml, no inferior a 0,4 g/ml o no inferior a 0,5 g/ml. En una realización preferida, el SP-304 o SP-333 purificado tiene una densidad aparente de aproximadamente 0,05-2 g/ml, aproximadamente 0,2-0,7 g/ml, aproximadamente 0,3-0,6 g/ml o aproximadamente 0,4-0,5 g/ml. En una realización, el SP-304 o SP-333 purificado tiene una densidad de compactación no inferior a 0,08 g/ml, no inferior a 0,1 g/ml, no inferior a 0,15 g/ml, no inferior a 0,2 g/ml, no inferior a 0,3 g/ml, no inferior a 0,4 g/ml, no inferior a 0,5 g/ml o no inferior a 0,6 g/ml. Por ejemplo, el SP-304 o SP-333 purificado tiene una densidad de compactación de 0,08-2 g/ml, aproximadamente 0,4-0,9 g/ml, aproximadamente 0,5-0,8 g/ml o aproximadamente 0,6-0,7 g/ml. En una realización, el péptido purificado SP-304 o SP-333 contiene <0,01 % de acetamida (por ejemplo, <28 ppm), <0,3 % de ion amonio (por ejemplo, <0,25 %), <0,01 % de acetonitrilo (por ejemplo, <20 ppm), y/o <0,1 % de TFA (por ejemplo, <0,09 %).
- En una realización, el péptido purificado SP-304 o SP-333 tiene una densidad aparente de 0,4-0,5 g/ml, tiene una densidad de compactación de 0,6-0,7 g/ml, y contiene <0,01 % de acetamida (por ejemplo, <28 ppm), <0,3 % de ion amonio (por ejemplo, <0,25 %), <0,01 % de acetonitrilo (por ejemplo, <20 ppm), y/o <0,1 % de TFA (por ejemplo, <0,09 %).
- El segundo aspecto de la invención proporciona un péptido purificado que tiene la secuencia agonista de guanilato ciclasa C seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 9 y 104, en donde el péptido purificado tiene las siguientes características:
- a) tiene una densidad aparente no superior a 0,1 g/ml;
 - b) contiene menos de 50 ppm de acetamida;
 - c) menos del 0,3 % de alfa-Asp-9-plenacanatida; y
 - d) menos del 0,05 % de ácido trifluoroacético.

El péptido purificado puede tener una o más de las siguientes características.

En una realización, el péptido es estable a 25 °C durante al menos tres meses.

5

En una realización, el péptido tiene una distribución del tamaño de partícula que tiene un valor D10 de entre aproximadamente 2 y 15 µm; un valor D50 de entre aproximadamente 15-50 µm; y un valor D90 de entre aproximadamente 40-80 µm cuando se mide mediante dispersión de luz con dispersante líquido.

10 En una realización, el péptido purificado no contiene más de 35 ppm de acetamida (por ejemplo, ≤18 ppm).

En una realización, el péptido purificado contiene menos del 0,15 % de alfa-Asp-9-plenacanatida (que tiene un tiempo de retención relativo (RRT) de -1,33 según el análisis por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) descrito en el presente documento).

15

En algunas realizaciones, el péptido purificado tiene una densidad aparente no superior a 0,09 g/ml, no superior a 0,08 g/ml, no superior a 0,07 g/ml, no superior a 0,06 g/ml, no superior a 0,05 g/ml, no superior a 0,04 g/ml o no superior a 0,03 g/ml.

20 En algunas realizaciones, el péptido purificado está sustancialmente libre de agua (por ejemplo, contenido de agua que no excede el 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3,5 %, 3 %, 2,5 %, 2 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 % o el 0,1 %, del peso total del péptido).

25 En algunas realizaciones, el péptido purificado tiene una pureza cromatográfica no inferior al 95 %, no inferior al 96 % o no inferior al 97 %.

En algunas realizaciones, el contenido total de impurezas en el péptido purificado es inferior al 3 % (por ejemplo, <2 % o <1 %).

30 En algunas realizaciones, el péptido purificado está además sustancialmente libre de una o más impurezas seleccionadas de acetonitrilo, alcoholes, amonio, acetatos y TFA.

Por ejemplo, el péptido purificado contiene menos de 300 ppm de acetonitrilo (por ejemplo, <250 ppm).

35 En algunas realizaciones, el péptido purificado contiene menos del 0,2 % de TFA (por ejemplo, <0,15 %, <0,1 %, <400 ppm, <300 ppm, <200 ppm, <100 ppm o <50 ppm).

40 En algunas realizaciones, el péptido purificado contiene menos del 0,2 % de isopropanol, es decir, IPA (por ejemplo, <0,15 %, <0,1 %, <1000 ppm, <900 ppm, <800 ppm, <700 ppm, <600 ppm, <500 ppm, <400 ppm, <300 ppm, <200 ppm, <100 ppm, <50 ppm o <20 ppm).

En algunas realizaciones, el péptido purificado contiene menos del 0,25 % de acetato (por ejemplo, <0,2 % o <0,1 %).

45 En algunas realizaciones, el péptido purificado está sustancialmente libre de topoisómeros (por ejemplo, <0,4 %, <0,3 %, <0,2 % o <0,1 %).

En algunas realizaciones, el péptido purificado está sustancialmente libre de iso-Asp2-plecanatida (RRT 0,96-0,97) (por ejemplo, <0,4 %, <0,3 %, <0,2 % o <0,1 %).

50 En algunas realizaciones, el péptido purificado tiene una pureza cromatográfica no inferior al 96 %, no inferior al 97 % o no inferior al 98 %. Por ejemplo, el péptido agonista de GCC tiene un contenido de impurezas cromatográficas no superior al 4 %, no superior al 3,5 %, no superior al 3 %, no superior al 2,5 %, no superior al 2 %, no superior al 1,5 % o no superior al 1 %. El contenido de impurezas cromatográficas se determina como porcentajes de área total de impurezas mediante HPLC. El contenido de impurezas cromatográficas incluye el contenido de topoisómeros. Las impurezas no incluyen ningún excipiente farmacéuticamente aceptable usado para la formulación de fármacos.

55

En algunas realizaciones, el péptido purificado está sustancialmente libre de contaminantes resultantes del proceso de preparación de péptidos tales como disolventes orgánicos usados en el proceso, por ejemplo, amonio, acetonitrilo, acetamida, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol o isopropanol), TFA, éter u otros contaminantes. En este contexto, "sustancialmente" libre de contaminantes significa que el contenido de contaminantes del péptido al final del proceso de purificación es preferentemente inferior al 0,5 %, inferior al 0,3 %, inferior al 0,25 %, inferior al 0,1 %, inferior al 0,05 %, inferior al 0,04 %, inferior al 0,03 %, inferior al 0,02 %, inferior al 0,01 %, inferior al 0,005 %, inferior al 0,003 %, o inferior al 0,001 % del peso total del péptido. Por ejemplo, el péptido purificado contiene <50 ppm de acetamida (por ejemplo, ≤35 ppm o ≤18 ppm), <300 ppm de acetonitrilo (por ejemplo, <250 ppm), <1000 ppm de TFA (por ejemplo, <400 ppm, <300 ppm, <200 ppm, <100 ppm o <50 ppm), <2000 ppm de isopropanol (por ejemplo, <1500 ppm, <1000 ppm, <500 ppm, <400 ppm, <300 ppm, <200 ppm, <100 ppm, <50 ppm o <20 ppm), y/o <0,25 % de acetato

60

65

(por ejemplo, <0,2 % o <0,1 %). El contenido de contaminantes se puede determinar mediante métodos convencionales tales como cromatografía de gases. Preferentemente, los disolventes residuales en el péptido purificado de la invención son inferiores a los límites establecidos en las directrices de la ICH, por ejemplo, IMPURITIES: GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS Q3C(R5) (disponible en http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Step4/Q3C_R5_Step4.pdf).

En algunas realizaciones, el péptido purificado contiene menos del 0,3 % (por ejemplo, <0,15 %) de alfa-Asp-9-plenacatanida (RRT 1,33).

En algunas realizaciones, el péptido purificado tiene una densidad aparente no superior a 0,09 g/ml, no superior a 0,08 g/ml, no superior a 0,07 g/ml, no superior a 0,06 g/ml, no superior a 0,05 g/ml, no superior a 0,04 g/ml o no superior a 0,03 g/ml.

En algunas realizaciones, el péptido purificado está sustancialmente libre de iso-Asp2-plecanatida (RRT ~0,96-0,97). En este contexto "sustancialmente" libre de iso-Asp2-plecanatida significa que el contenido de iso-Asp2-plecanatida del péptido al final del proceso de purificación es preferentemente inferior al 2 %, inferior al 1,5 %, inferior al 1,25 %, inferior al 1 %, inferior al 0,9 %, inferior al 0,8 %, inferior al 0,7 %, inferior al 0,6 %, inferior al 0,5 %, inferior al 0,4 %, inferior al 0,3 %, inferior al 0,2 % o inferior al 0,1 %, del peso total del péptido.

En algunas realizaciones, el péptido purificado está sustancialmente libre de topoisómeros. En este contexto, "sustancialmente" libre de topoisómeros significa que el contenido de topoisómeros del péptido al final del proceso de purificación es preferentemente inferior al 2 %, inferior al 1,5 %, inferior al 1,25 %, inferior al 1 %, inferior al 0,9 %, inferior al 0,8 %, inferior al 0,7 %, inferior al 0,6 %, inferior al 0,5 %, inferior al 0,4 %, inferior al 0,3 %, inferior al 0,2 % o inferior al 0,1 %, del peso total del péptido.

En algunas realizaciones, el péptido purificado está sustancialmente libre de agua. En este contexto, "sustancialmente" libre de agua significa que el contenido de agua del péptido al final del proceso de purificación es preferentemente inferior al 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, inferior al 6 %, inferior al 5 %, inferior al 4,5 %, inferior al 4,25 %, inferior al 4 %, inferior al 3,5 %, inferior al 3 %, inferior al 2,5 %, inferior al 2 %, inferior al 1,5 %, inferior al 1 %, inferior al 0,5 %, inferior al 0,25 % o inferior al 0,1 %, del peso total del péptido.

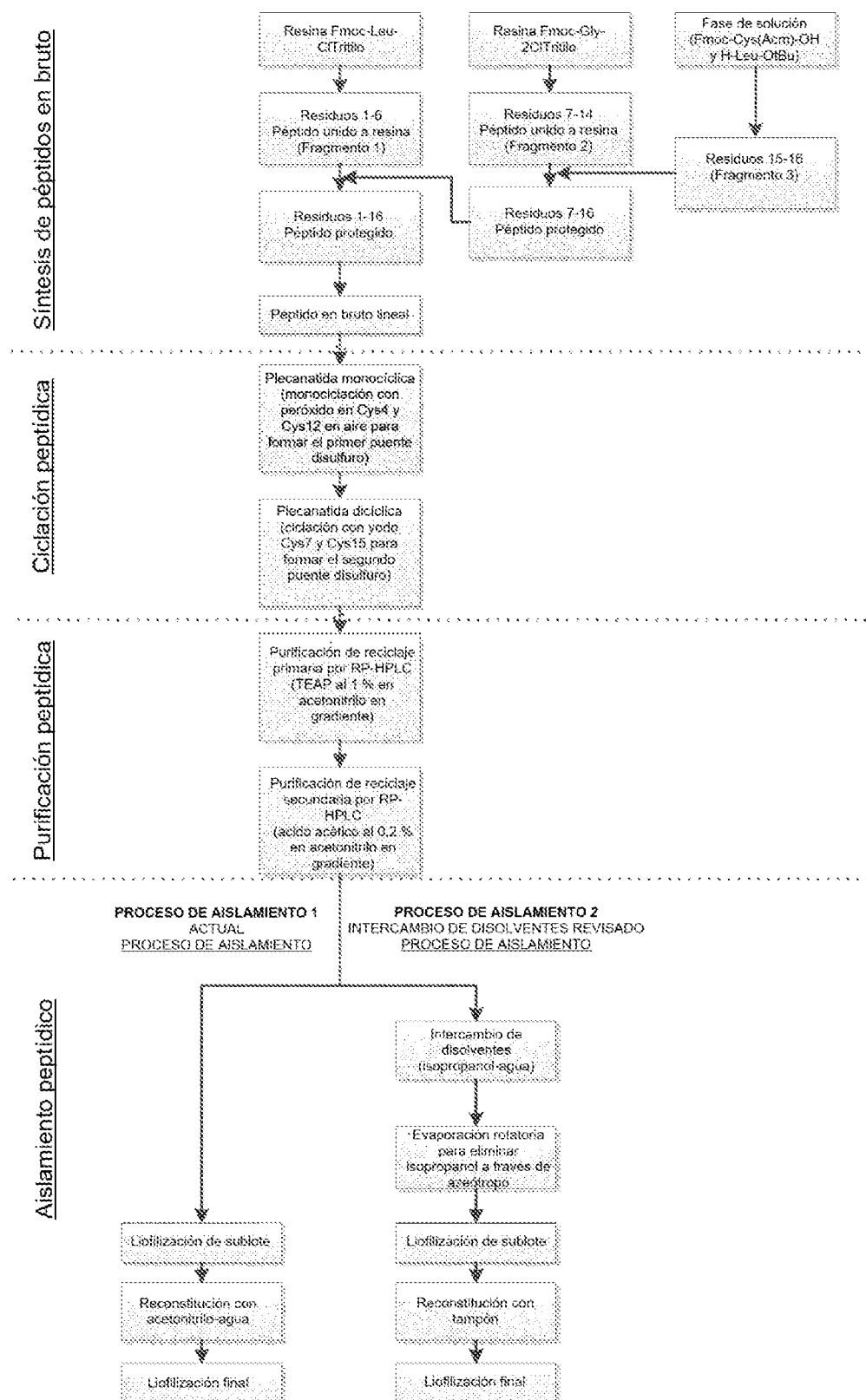
Por ejemplo, el péptido purificado tiene una distribución del tamaño de partícula caracterizada por un valor D50 de aproximadamente 600 µm cuando se mide mediante dispersión de luz con dispersante de aire. En comparación, los péptidos purificados a partir de los procesos de liofilización y precipitación descritos en el documento WO2012/118972 tienen valores D50 de aproximadamente 180-250 µm y aproximadamente 300 µm, respectivamente.

Por ejemplo, el péptido purificado preparado mediante los procesos de la invención tiene una distribución de tamaño adecuada para la formulación farmacéutica. En una realización, el péptido (por ejemplo, SP-304) tiene una distribución de tamaño (por ejemplo, un tamaño promedio de 80-120 µm) comparable a la del excipiente farmacéutico (por ejemplo, celulosa microcristalina) usado en la formulación, por ejemplo, en forma de dosis unitaria de 3 mg/día. La distribución de tamaño del péptido purificado puede variar basándose en la dosis unitaria. Por ejemplo, cuando la dosis unitaria es inferior a 3 mg/día, el péptido purificado en la formulación farmacéutica tiene un tamaño promedio menor que el de la dosis de 3 mg/día. Por ejemplo, el péptido purificado preparado mediante los procesos de la invención se muele para alcanzar la distribución de tamaño adecuada.

La distribución de tamaño del péptido de la invención se puede determinar mediante métodos tradicionales, tales como análisis de tamiz, oscurecimiento de la luz o análisis de dispersión dinámica de la luz.

En un primer aspecto, la invención proporciona un proceso de purificación de péptidos purificadores, incluidos los sintetizados mediante los métodos híbridos divulgados en el presente documento. El proceso incluye, por ejemplo, las etapas (denominadas "proceso de aislamiento 2") ilustradas en el Esquema 12 a continuación, en comparación con las etapas de aislamiento descritas en el documento WO2012/118972 (denominadas "proceso de aislamiento 1").

Esquema 12



En una realización, el proceso de purificación de la divulgación incluye las siguientes etapas:

- Monociclación del péptido en bruto lineal: El enlace disulfuro entre Cys⁴ y Cys¹² de SP-304 se forma primero mediante oxidación de H₂O₂ a un pH de 8,0-8,5 para formar el péptido en bruto monociclado. El péptido en bruto lineal se añade

lentamente y se disuelve en acetato de amonio al 0,5 % en tampón de agua con H₂O₂ añadido previamente en una relación de 100:9 gramos de péptido por ml de H₂O₂ para producir una concentración en bruto final de aproximadamente 1,0 mg/ml. A continuación, el pH de la solución se ajusta a 8,5 con una solución de NH₄OH mientras se agita al aire libre. La reacción de monociclación oxidativa se controla, por ejemplo, usando el método de HPLC 2 como se describe en el Ejemplo 8. Cuando el % de área del péptido en bruto lineal es ≤5,0 % del % de área del péptido monociclado, la reacción de oxidación se detiene ajustando el pH de solución de péptido a 1,7-2 usando una solución de TFA. A continuación, la solución peptídica se transfiere a la siguiente etapa para la formación del péptido dicitado.

Dicitación del péptido monociclado: El enlace disulfuro entre Cys7 y Cys15 se forma con I₂ al 3,0 % (p/v) en solución de acetonitrilo. El puente disulfuro se crea al mismo tiempo que se eliminan los grupos protectores de la cadena lateral de Acm presentes en los residuos de Cys restantes. La reacción de dicitación oxidativa se controla, por ejemplo, usando el método de HPLC 2. El exceso de yodo se inactiva con una solución de ácido ascórbico 0,1 M en agua. Una vez completada la reacción, el péptido dicitado se ajusta a pH 6,5-7 usando una solución de NH₄OH y el material se prepara para la purificación primaria.

Purificación primaria del péptido en bruto dicitado: La solución peptídica en bruto dicitado resultante de las etapas de oxidación se carga a continuación en una columna de RP-HPLC preparativa empaquetada con resina de fase inversa Cis que funciona mediante un sistema de HPLC preparativa. El péptido se eluye en un sistema de tampón de TEAP al 1 % en agua, pH 7/ACN. El método de HPLC 1 como se describe en el Ejemplo 8, por ejemplo, se usa para determinar el porcentaje de pureza de las fracciones y conjuntos obtenidos durante la etapa de purificación primaria.

Purificación de uno o más grupos de reciclaje del péptido dicitado: Después de la purificación primaria, las fracciones que requieren purificación adicional se purifican basándose en la pureza de los grupos de fracciones usando un sistema de tampón de TEAP al 1 % en agua, pH 7/ACN o de ácido acético al 0,2 % en agua/ACN. La solución peptídica en bruto dicitado resultante de las etapas de oxidación se carga a continuación en una columna de RP-HPLC preparativa empaquetada con resina de fase inversa C₁₈ que funciona mediante un sistema de HPLC preparativa. El péptido se eluye en un sistema de tampón de TEAP al 1 % en agua, pH 7/ACN. El método de HPLC 1 como se describe en el Ejemplo 8, por ejemplo, se usa para determinar el porcentaje de pureza de las fracciones y conjuntos obtenidos durante el análisis de purificación de reciclaje.

Purificación secundaria e intercambio de sal: Después de la purificación de reciclaje, las fracciones que requieren purificación adicional se purifican basándose en la pureza de los grupos de fracciones usando un sistema de tampón de TEAP al 1 % en agua, pH 7/ACN o de ácido acético al 0,2 % en agua/ACN. El método de HPLC 1 como se describe en el Ejemplo 8, por ejemplo, se usa para determinar el porcentaje de pureza de las fracciones y conjuntos obtenidos durante el análisis de purificación secundaria. El método de UPLC 1 como se describe en el Ejemplo 8, por ejemplo, se usa para determinar el porcentaje de pureza del grupo principal obtenido durante todo el análisis de purificación antes de pasar a la siguiente etapa.

Intercambio de disolventes: El material que cumple con los criterios del grupo principal se carga en la columna de RP-HPLC preparativa en el extremo de la brida en la dirección inversa, se lava con una solución de agua/isopropanol (por ejemplo, con una relación de agua con respecto a isopropanol de 99:1) desde la dirección inversa, y se eluye con una solución de agua/isopropanol (por ejemplo, con una relación de agua con respecto a isopropanol de 60:40) en la dirección de avance. La solución peptídica recogida se ensaya mediante el método de UPLC 1 para determinar la pureza, a continuación, la solución peptídica se filtra, se somete a evaporación rotatoria para eliminar el exceso de isopropanol (por ejemplo, por debajo del 5 %), seguido de una liofilización del sublotte durante, por ejemplo, no menos de 96 horas.

Reconstitución y liofilización final: El péptido seco liofilizado del sublotte se somete a reconstitución en agua para formar un lote homogéneo. A la solución se le añade un tampón, tal como acetato de amonio (por ejemplo, 0,5 % (p/p) para secar el péptido), y se mezcla hasta que se disuelven el acetato de amonio y el péptido. El material se puede analizar mediante el método de UPLC 1 para verificar la pureza. El material disuelto se puede instalar en el liofilizador de bandeja y mantenerse al vacío durante, por ejemplo, no menos de 120 horas para comprender el material peptídico seco final.

1.1 Agonistas de GCC

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

La expresión "agonista de GCC" se refiere tanto a péptidos como a compuestos no peptídicos tales como los que se

unen a una guanilato ciclasa C intestinal y estimulan la producción intracelular de cGMP. Cuando el agonista de GCC es un péptido, la expresión abarca fragmentos biológicamente activos de dichos péptidos y propéptidos que se unen a la guanilato ciclasa C y estimulan la producción intracelular de cGMP.

5 1.1.1 Péptidos agonistas de GCC

Los agonistas de GCC adecuados para los métodos de la invención son péptidos. En algunas realizaciones, el péptido agonista de GCC tiene menos de 30 aminoácidos de longitud. En realizaciones particulares, el péptido agonista de GCC tiene una longitud inferior o igual a 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10 o 5 aminoácidos. Los ejemplos de péptidos agonistas de GCC para su uso en las formulaciones y métodos divulgados en el presente documento incluyen los descritos en las Patentes de EE.UU. N.º 7.879.802 y 8.034.782, y las Publicaciones de EE.UU. N.º US 2010-0069306 y US 2010-0120694.

Los ejemplos específicos de péptidos agonistas de GCC que se pueden purificar o preparar mediante los métodos de la divulgación incluyen los descritos en las Tablas I-VII a continuación. Como se usan en las Tablas I-VII, los términos "PEG3" o "3PEG" se refieren a un polietilenglicol tal como ácido aminoetiloxi-etiloxi-acético (AeeA) y polímeros del mismo. Como se usa en el presente documento, el término "AMIDA" pretende indicar que el ácido carboxílico terminal se reemplaza por un grupo amida, es decir, el COOH terminal se reemplaza por CONH₂.

El término "X_{aa}" se refiere a cualquier aminoácido o análogo de aminoácido natural o no natural. El término "M_{aa}" se refiere a cisteína (Cys), penicilamina (Pen), homocisteína o 3-mercaptoprolina. El término "Xaam" pretende indicar una secuencia de aminoácidos de cualquier aminoácido o análogo de aminoácido natural o no natural que tenga uno, dos o tres residuos de longitud; Xaa_{n2} pretende indicar una secuencia de aminoácidos que tiene cero o un residuo de longitud; y Xaa_{n3} pretende indicar una secuencia de aminoácidos de cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de longitud. Además, cualquier aminoácido representado por Xaa, Xaa_{n1}, Xaa_{n2}, o Xaa_{n3} puede ser un L-aminoácido, un D-aminoácido, un aminoácido metilado o cualquier combinación de los mismos. Opcionalmente, cualquier péptido agonista de GCC representado por las Fórmulas I a XX en las tablas puede contener uno o más residuos de polietilenglicol en el extremo N, el extremo C o ambos.

Un agonista de GCC purificado o preparado mediante el método de la invención comprende un péptido seleccionado de las SEQ ID NO: 1-54 y 56-251, cuyas secuencias se exponen a continuación en las Tablas I a VII siguientes. En una realización, un agonista de GCC purificado mediante los métodos de la invención comprende el péptido designado por las SEQ ID NO: 1, 9 o 104.

En determinadas realizaciones de la divulgación que no forman parte de la invención reivindicada, un agonista de GCC preparado mediante los métodos divulgados en el presente documento comprende un péptido que es sustancialmente equivalente a un péptido seleccionado de las SEQ ID NO: 1-251. La expresión "sustancialmente equivalente" se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos equivalente a la del dominio de unión donde determinados residuos pueden eliminarse o reemplazarse por otros aminoácidos sin perjudicar la capacidad del péptido para unirse a un receptor de guanilato ciclasa intestinal y estimular el transporte de líquidos y electrolitos.

En determinadas realizaciones de la divulgación que no forman parte de la invención reivindicada, un agonista de GCC preparado mediante los métodos divulgados en el presente documento comprende un péptido que es análogo a un péptido seleccionado de las SEQ ID NO: 1-251. Particularmente, estos análogos contienen un ácido α -aminoadípico (Aad), preferentemente en la 3ª posición desde el extremo N de cada péptido o en la posición hacia el lado del extremo N junto al primer residuo de cisteína ("Cys").251

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

Los péptidos agonistas de GCC preparados mediante los métodos de la invención pueden ser polímeros de L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de ambos. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los péptidos son péptidos D retroinversos. La expresión "isómero retroinverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el que se invierte la dirección de la secuencia se revierte y la quiralidad de cada residuo de aminoácido está invertida. Véanse, por ejemplo, Jameson *et al.*, Nature, 368, 744-746 (1994); Brady *et al.*, Nature, 368, 692-693 (1994). El resultado neto de combinar enantiómeros D y síntesis inversa es que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amida se intercambian, mientras que se conserva la posición de los grupos de cadena lateral en cada carbono alfa. A menos que se indique específicamente lo contrario, se supone que cualquier secuencia de L-aminoácidos dada de la invención puede convertirse en un péptido D retroinverso sintetizando una secuencia inversa de la secuencia de L-aminoácidos nativa correspondiente.

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

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

Los ejemplos específicos de péptidos agonistas de GCC que se pueden preparar mediante los métodos de la invención incluyen un péptido seleccionado del grupo designado por las SEQ ID NO: 1-54 y 56-251.

En una realización, el péptido agonista de GCC es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las Fórmulas X-XVII (por ejemplo, las SEQ ID NO: 87-98).

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

En realizaciones alternativas, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de Fórmula II, en donde al menos un aminoácido de Fórmula II es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferentemente, el aminoácido representado por Xaa_{n2} de Fórmula II es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. En algunas realizaciones, el aminoácido representado por Xaa_{n2} de Fórmula II es una leucina, una d-leucina, una serina o una d-serina. Preferentemente, el uno o más aminoácidos representados por Xaa_{n1} de Fórmula II son un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferentemente, el aminoácido en la posición Xaa⁶ de Fórmula II es una leucina, una serina o una tirosina.

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

En otras realizaciones, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de Fórmula IV, en donde al menos un aminoácido de Fórmula IV es un D-aminoácido o un aminoácido metilado, y/o Maa no es una cisteína. Preferentemente, el Xaa_{n2} de Fórmula IV es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. En algunas realizaciones, el aminoácido representado por Xaa_{n2} de Fórmula IV es una leucina, una d-leucina, una serina o una d-serina. Preferentemente, el uno o más de los aminoácidos representados por Xaa_{n1} de Fórmula IV son un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferentemente, el aminoácido representado por Xaa⁶ de Fórmula IV es una leucina, una serina o una tirosina.

En realizaciones adicionales, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de Fórmula V, en donde al menos un aminoácido de Fórmula V es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferentemente, el aminoácido en la posición 16 de Fórmula V es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 16 (es decir, Xaa¹⁶) de Fórmula V es una d-leucina o una d-serina. Opcionalmente, uno o más de los aminoácidos en la posición 1-3 de Fórmula V son D-aminoácidos o aminoácidos metilados o una combinación de D-aminoácidos o aminoácidos metilados. Por ejemplo, Asn¹, Asp² o Glu³ (o una combinación de los mismos) de Fórmula V son un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferentemente, el

aminoácido representado en Xaa⁶ de Fórmula V es una leucina, una serina o una tirosina.

En realizaciones adicionales, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de Fórmula VI, VII, VIII o IX. Preferentemente, el aminoácido en la posición 6 de Fórmula VI, VII, VIII o IX es una leucina, una serina o una tirosina. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 16 de Fórmula VI, VII, VIII o IX es una leucina o una serina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 16 de Fórmula V es un D-aminoácido o un aminoácido metilado.

En realizaciones adicionales, los péptidos agonistas de GCC incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de Fórmula X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI o XVII. Opcionalmente, uno o más aminoácidos de las Fórmulas X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI o XVII son un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Preferentemente, el aminoácido en el extremo carboxi de los péptidos de acuerdo con las Fórmulas X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI o XVII es un D-aminoácido o un aminoácido metilado. Por ejemplo, el aminoácido en el extremo carboxi de los péptidos de acuerdo con las Fórmulas X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI o XVII es una D-tirosina.

Preferentemente, el aminoácido representado por Xaa⁶ de Fórmula XIV es una tirosina, fenilalanina o una serina. Mucho más preferentemente, el aminoácido representado por Xaa⁶ de Fórmula XIV es una fenilalanina o una serina. Preferentemente, el aminoácido representado por Xaa⁴ de Fórmula XV, XVI o XVII es una tirosina, una fenilalanina o una serina. Mucho más preferentemente, el aminoácido en la posición Xaa⁴ de Fórmula V, XVI o XVII es una fenilalanina o una serina.

En algunas realizaciones, los péptidos GCRA incluyen péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos de Fórmula XVIII. Preferentemente, el aminoácido en la posición 1 de Fórmula XVIII es un ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o lisina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 2 y 3 de Fórmula XVIII es un ácido glutámico o un ácido aspártico. Preferentemente, el aminoácido en la posición 5 es un ácido glutámico. Preferentemente, el aminoácido en la posición 6 de Fórmula XVIII es una isoleucina, valina, serina, treonina o tirosina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 8 de Fórmula XVIII es una valina o isoleucina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 9 de Fórmula XVIII es una asparagina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 10 de Fórmula XVIII es una valina o una metionina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 11 de Fórmula XVIII es una alanina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 13 de Fórmula XVIII es una treonina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 14 de Fórmula XVIII es una glicina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 16 de Fórmula XVIII es una leucina, serina o treonina.

En realizaciones alternativas, los péptidos GCRA incluyen péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos de Fórmula XIX. Preferentemente, el aminoácido en la posición 1 de Fórmula XIX es una serina o asparagina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 2 de Fórmula XIX es una histidina o un ácido aspártico. Preferentemente, el aminoácido en la posición 3 de Fórmula XIX es una treonina o un ácido glutámico. Preferentemente, el aminoácido en la posición 5 de Fórmula XIX es un ácido glutámico. Preferentemente, el aminoácido en la posición 6 de Fórmula XIX es una isoleucina, leucina, valina o tirosina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 8, 10, 11 o 13 de Fórmula XIX es una alanina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 9 de Fórmula XIX es una asparagina o una fenilalanina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 14 de Fórmula XIX es una glicina.

En realizaciones adicionales, los péptidos GCRA incluyen péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos de Fórmula XX. Preferentemente, el aminoácido en la posición 1 de Fórmula XX es una glutamina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 2 o 3 de Fórmula XX es un ácido glutámico o un ácido aspártico. Preferentemente, el aminoácido en la posición 5 de Fórmula XX es un ácido glutámico. Preferentemente, el aminoácido en la posición 6 de Fórmula XX es treonina, glutamina, tirosina, isoleucina o leucina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 8 de Fórmula XX es isoleucina o valina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 9 de Fórmula XX es asparagina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 10 de Fórmula XX es metionina o valina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 11 de Fórmula XX es alanina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 13 de Fórmula XX es una treonina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 1 de Fórmula XX es una glicina. Preferentemente, el aminoácido en la posición 15 de Fórmula XX es una tirosina. Opcionalmente, el aminoácido en la posición 15 de Fórmula XX tiene dos aminoácidos de longitud y es cisteína (Cys), penicilamina (Pen) homocisteína o 3-mercaptoprolina y serina, leucina o treonina.

En determinadas realizaciones, uno o más aminoácidos de los péptidos agonistas de GCC se reemplazan por un aminoácido de origen no natural o un análogo de aminoácido de origen natural o no natural. Dichos aminoácidos y análogos de aminoácidos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Hunt, "The Non-Protein Amino Acids", en Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, Barrett, Chapman y Hall, 1985. En algunas realizaciones, un aminoácido se reemplaza por un aminoácido de origen natural no esencial, por ejemplo, taurina. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos de origen natural que se pueden reemplazar por aminoácidos no proteicos incluyen los siguientes: (1) un aminoácido aromático se puede reemplazar por 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, 3-yodo-L-tirosina, triyodotironina, L-tiroxina, fenilglicina (Phg) o nortirosina (norTyr); (2) Phg y norTyr y otros aminoácidos, incluyendo Phe y Tyr, se pueden sustituir, por ejemplo, por un halógeno, -CH₃, -OH, -CH₂NH₃, -C(O)H, -CH₂CH₃, -CN, -CH₂CH₂CH₃, -SH u otro grupo; (3) los residuos de glutamina se pueden sustituir por gamma-hidroxi-Glu o gamma-

carboxi-Glu; (4) los residuos de tirosina se pueden sustituir por un aminoácido alfa sustituido tal como L-alfa-metilfenilalanina o por análogos tales como: 3-Amino-Tyr; Tyr(CH₃); Tyr(PO₃(CH₃)₂); Tyr(SO₃H); beta-ciclohexil-Ala; beta-(1-ciclopentenil)-Ala; beta-ciclopentil-Ala; beta-ciclopropil-Ala; beta-quinolil-Ala; beta-(2-tiazolil)-Ala; beta-(triazol-1-il)-Ala; beta-(2-piridil)-Ala; beta-(3-piridil)-Ala; amino-Phe; fluoro-Phe; ciclohexil-Gly; tBu-Gly; beta-(3-benzotienil)-Ala; beta-(2-tienil)-Ala; 5-metil-Trp; y A-metil-Trp; (5) los residuos de prolina se pueden sustituir por homopro (ácido L-pipecólico); hidroxil-Pro; 3,4-deshidro-Pro; 4-fluoro-Pro; o alfa-metil-Pro o un análogo de aminoácido ciclado N(alfa)-C(alfa) con la estructura: n = 0, 1, 2, 3; y (6) los residuos de alanina se pueden sustituir por aminoácidos alfa-sustituidos o N-metilados tales como ácido alfa-amino isobutírico (aib), LID-alfa-etilalanina (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 se puede sustituir por: n = 0, 1, 2, 3 Los residuos de glicina se pueden sustituir por ácido alfa-amino isobutírico (aib) o L/D-alfa-etilalanina (L/D-isovalina).

Los ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales incluyen: un análogo no natural de tirosina; un análogo no natural de glutamina; un análogo no natural de fenilalanina; un análogo no natural de serina; un análogo no natural de treonina; un alquilo, arilo, acilo, azido, ciano, halo, hidrazina, hidrazida, hidroxilo, alquenilo, alquinilo, éter, tiol, sulfonilo, seleno, éster, tioácido, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, hidroxilamina, ceto o aminoácido sustituido con amino, o cualquier combinación de los mismos; un aminoácido con un agente de reticulación fotoactivable; un aminoácido marcado con espín; un aminoácido fluorescente; un aminoácido con un grupo funcional novedoso; un aminoácido que interactúa covalente o no covalentemente con otra molécula; un aminoácido de unión a metales; un aminoácido que está amidado en un sitio que no está amidado naturalmente, un aminoácido que contiene metal; un aminoácido radiactivo; un aminoácido fotoactivado y/o fotoisomerizable; un aminoácido que contiene biotina o análogo de biotina; un aminoácido glucosilado o modificado con carbohidratos; 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, ¹³C, ¹⁵N o ¹⁸O); un aminoácido químicamente escindible o fotoescindible; un aminoácido con una cadena lateral alargada; un aminoácido que contiene un grupo tóxico; un aminoácido sustituido con azúcar, por ejemplo, una serina sustituida con azúcar o similares; un aminoácido que contiene azúcar ligado al carbono; un aminoácido redox activo; un ácido que contiene α-hidroxi; un aminoácido que contiene ácido amino tio; un aminoácido α, α disustituido; un β-aminoácido; un aminoácido cíclico distinto de prolina; una O-metil-L-tirosina; una L-3-(2-naftil)alanina; una 3-metil-fenilalanina; una p-acetil-L-fenilalanina; una O-4-alil-L-tirosina; una 4-propil-L-tirosina; una tri-O-acetil-GlcNAc β-serina; una L-Dopa; una fenilalanina fluorada; una isopropil-L-fenilalanina; una p-azido-L-fenilalanina; una p-acil-L-fenilalanina; una p-benzoil-L-fenilalanina; una L-fosfoserina; una fosfonoserina; una fosfotirosina; una p-yodo-fenilalanina; una 4-fluorofenilglicina; una p-bromofenilalanina; una p-amino-L-fenilalanina; una isopropil-L-fenilalanina; L-3-(2-naftil)alanina; D-3-(2-naftil)alanina (dNal); un análogo de fenilalanina que contiene amino, isopropilo u O-alilo; una dopa, O-metil-L-tirosina; un aminoácido glucosilado; una p-(propargiloxi)fenilalanina; dimetil-lisina; hidroxil-prolina; ácido mercaptopropiónico; metil-lisina; 3-nitro-tirosina; norleucina; ácido piroglutámico; Z (carbобензохило); ε-acetil-lisina; β-alanina; derivado de aminobenzoílo; ácido aminobutírico (Abu); citrulina; ácido aminohexanoico; ácido aminoisobutírico (AIB); ciclohexilalanina; d-ciclohexilalanina; hidroxiprolina; nitro-arginina; nitro-fenilalanina; nitro-tirosina; norvalina; carboxilato de octahidroindol; ornitina (Orn); penicilamina (PEN); tetrahidroisoquinolina; aminoácidos protegidos con acetamidometilo y aminoácidos pegilados. Se pueden encontrar ejemplos adicionales de aminoácidos no naturales y análogos de aminoácidos en el documento U.S. 20030108885, U.S. 20030082575, US20060019347 (párrafos 410-418) y las referencias citadas en los mismos. Los polipéptidos de la invención pueden incluir modificaciones adicionales, incluidas las descritas en el documento US20060019347, párrafo 589. Los péptidos agonistas de GCC de ejemplo que incluyen un aminoácido de origen no natural incluyen, por ejemplo, SP-368 y SP-369.

En algunas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC son péptidos cíclicos. Los péptidos cíclicos agonistas de GCC se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la macrociclación a menudo se logra formando un enlace amida entre los extremos N y C del péptido, entre una cadena lateral y el extremo N o C [por ejemplo, con K₃Fe(CN)₆ a pH 8,5] (Samson *et al.*, Endocrinology, 137: 5182-5185 (1996)), o entre dos cadenas laterales de aminoácidos, tales como cisteína. Véase, por ejemplo, DeGrado, Adv Protein Chem, 39: 51-124 (1988). En diversas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC son biciclos [4,12; 7,15].

En determinadas realizaciones, uno o ambos residuos de Cys que normalmente forman un enlace disulfuro en un péptido agonista de GCC se reemplazan por homocisteína, penicilamina, 3-mercaptoprolina (Kolodziej *et al.* 1996 Int. J. Pept. Protein Res. 48:274), β, β dimetilcisteína (Hunt *et al.* 1993 Int. J. Pept. Protein Res. 42:249) o ácido diaminopropiónico (Smith *et al.* 1978 J. Med. Chem. 21:117) para formar entrecruzamientos internos alternativos en las posiciones de los enlaces disulfuro normales.

En determinadas realizaciones, uno o más enlaces disulfuro en un péptido agonista de GCC se reemplazan por entrecruzamientos covalentes alternativos, por ejemplo, un enlace amida (-CH₂CH(O)NHCH₂- o -CH₂NHCH(O)CH₂-), un enlace éster, un enlace tioéster, un puente lactama, un enlace carbamóilo, un enlace de urea, un enlace de tiourea, un enlace éster fosfonato, un enlace alquilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), un enlace alquenilo (-CH₂CH=CHCH₂-), un enlace éter (-CH₂CH₂OCH₂- o -CH₂OCH₂CH₂-), un enlace tioéter (-CH₂CH₂SCH₂- o -CH₂SCH₂CH₂-), un enlace amina (-CH₂CH₂NHCH₂- o -CH₂NHCH₂CH₂-) o un enlace tioamida (-CH₂C(S)NHCH₂- o -CH₂NHC(S)CH₂-). Por ejemplo, Ledu *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 100:11263-78, 2003) describen métodos para preparar entrecruzamientos de lactama y amida. Los péptidos agonistas de GCC de ejemplo que incluyen un puente lactámico incluyen, por ejemplo, SP-370.

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

En determinadas realizaciones, los péptidos agonistas de GCC se modifican usando modificaciones estándar. Pueden aparecer modificaciones en el extremo amino (N), carboxi (C), internamente o una combinación de cualquiera de las anteriores. En un aspecto descrito en el presente documento, puede haber más de un tipo de modificación en el polipéptido. Las modificaciones incluyen, pero sin limitación: acetilación, amidación, biotilación, cinamoilación, farnesilación, formilación, miristoilación, palmitoilación, fosforilación (Ser, Tyr o Thr), estearoilación, succinilación, sulfurilación y ciclación (a través de puentes disulfuro o ciclación de amida), y modificación por Cys3 o Cys5. Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento también pueden modificarse mediante 2, 4-dinitrofenilo (DNP), DNP-lisina, modificación mediante 7-amino-4-metilcumarina (AMC), fluoresceína, NBD (7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol), p-nitro-anilida, rodamina B, EDANS (ácido 5-((2-aminoetil)amino)naftaleno-1-sulfónico), dabciilo, dabsilo, dansilo, rojo texas, FMOC y Tamra (tetrametilrodamina). Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento también pueden conjugarse con, por ejemplo, polietilenglicol (PEG); grupos alquilo (por ejemplo, grupos alquilo C1-C20 lineal o ramificado); restos de ácidos grasos; combinaciones de PEG, grupos alquilo y restos de ácidos grasos (véase la Patente de EE.UU. 6.309.633; Soltero *et al.*, 2001 Innovations in Pharmaceutical Technology 106-110); BSA y KLH (hemocianina de lapa californiana). La adición de PEG y otros polímeros que se pueden usar para modificar polipéptidos de la invención se describe en el documento US20060 19347, sección IX.

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

En una realización de la divulgación, un péptido agonista de GCC preparado mediante los métodos descritos en el presente documento se somete a mutagénesis aleatoria para identificar mutantes que tienen actividad biológica.

En una realización de la divulgación, los métodos divulgados en el presente documento se pueden usar para preparar un péptido agonista de GCC que es sustancialmente homólogo a un péptido agonista de GCC descrito en el presente documento. Dichos péptidos sustancialmente homólogos se pueden aislar en virtud de la reactividad cruzada con anticuerpos con respecto a un péptido agonista de GCC descrito en el presente documento.

Se encuentran ejemplos adicionales de péptidos agonistas de GCC que se pueden preparar mediante los métodos de la divulgación en las Tablas I-VII a continuación.

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

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

Además de la síntesis peptídica en fase de solución o en fase sólida convencional descrita anteriormente, los péptidos agonistas de GCC o sus fragmentos se pueden producir mediante técnicas de clonación modernas. Por ejemplo, los péptidos agonistas de GCC se producen en bacterias que incluyen, sin limitación, *E. coli*, o en otros sistemas existentes para la producción de polipéptidos o proteínas (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, sistemas de expresión de baculovirus que usan células Sf9 de *Drosophila*, sistemas de expresión de hongos filamentosos o levaduras, sistemas de expresión de células de mamífero), o pueden sintetizarse químicamente. Si el péptido agonista de GCC o el péptido variante se va a producir en bacterias, por ejemplo, *E. coli*, la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido también puede codificar una secuencia líder que permite la secreción del polipéptido maduro de la célula. Por lo tanto, la secuencia

que codifica el polipéptido puede incluir la secuencia pre y la secuencia pro de, por ejemplo, un polipéptido ST bacteriano de origen natural. El polipéptido maduro secretado se puede purificar del medio de cultivo.

La secuencia que codifica un péptido agonista de GCC descrito en el presente documento se puede insertar en un vector capaz de suministrar y mantener la molécula de ácido nucleico en una célula bacteriana. La molécula de ADN puede insertarse en un vector de replicación autónoma (los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, pGEM3Z y pcDNA3, y derivados de los mismos). El ácido nucleico vector puede ser un ADN bacteriano o bacteriófago tal como bacteriófago lambda o M13 y derivados de los mismos. La construcción de un vector que contiene un ácido nucleico descrito en el presente documento puede ir seguida de la transformación de una célula hospedadora tal como una bacteria. Los hospedadores bacterianos adecuados incluyen, pero sin limitación, *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Salmonella*. La construcción genética también incluye, además de la molécula de ácido nucleico codificante, elementos que permiten la expresión, tal como un promotor y secuencias reguladoras. Los vectores de expresión pueden contener secuencias de control transcripcional que controlan la iniciación transcripcional, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras.

Los expertos en la técnica conocen una diversidad de secuencias de control transcripcional. El vector de expresión también puede incluir una secuencia reguladora de la traducción (por ejemplo, una secuencia 5' no traducida, una secuencia 3' no traducida o un sitio interno de entrada al ribosoma). El vector puede ser capaz de replicarse de forma autónoma o puede integrarse en el ADN del hospedador para garantizar la estabilidad durante la producción de polipéptidos.

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

Las construcciones genéticas y los métodos adecuados para la producción de formas inmaduras y maduras de los péptidos agonistas de GCC y variantes descritas en el presente documento en sistemas de expresión de proteínas distintos de las bacterias, y bien conocidos por los expertos en la técnica, también se pueden usar para producir polipéptidos en un sistema biológico.

Los péptidos divulgados en el presente documento pueden modificarse mediante la unión de una segunda molécula que confiere una propiedad deseada al péptido, tal como una mayor semivida en el cuerpo, por ejemplo, pegilación. Dichas modificaciones también entran dentro del alcance del término "variante" como se usa en el presente documento.

Tabla I. Péptidos GCRA (SP-304 y derivados)

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
SP-304	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	1
SP-326	C3:C11, C6:C14	Asp ¹ -Glu ² -Cys ³ -Glu ⁴ -Leu ⁵ -Cys ⁶ -Val ⁷ -Asn ⁸ -Val ⁹ -Ala ¹⁰ -Cys ¹¹ -Thr ¹² -Gly ¹³ -Cys ¹⁴ -Leu ¹⁵	2
SP-327	C2:C10, C5:C13	Asp ¹ -Glu ² -Cys ³ -Glu ⁴ -Leu ⁵ -Cys ⁶ -Val ⁷ -Asn ⁸ -Val ⁹ -Ala ¹⁰ -Cys ¹¹ -Thr ¹² -Gly ¹³ -Cys ¹⁴	3
SP-328	C2:C10, C5:C13	Glu ¹ -Cys ² -Glu ³ -Leu ⁴ -Cys ⁵ -Val ⁶ -Asn ⁷ -Val ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Leu ¹⁴	4
SP-329	C2:C10, C5:C13	Glu ¹ -Cys ² -Glu ³ -Leu ⁴ -Cys ⁵ -Val ⁶ -Asn ⁷ -Val ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³	5
SP-330	C1:C9, C4:C12	Cys ¹ -Glu ² -Leu ³ -Cys ⁴ -Val ⁵ -Asn ⁶ -Val ⁷ -Ala ⁸ -Cys ⁹ -Thr ¹⁰ -Gly ¹¹ -Cys ¹² -Leu ¹³	6
SP-331	C1:C9, C4:C12	Cys ¹ -Glu ² -Leu ³ -Cys ⁴ -Val ⁵ -Asn ⁶ -Val ⁷ -Ala ⁸ -Cys ⁹ -Thr ¹⁰ -Gly ¹¹ -Cys ¹²	7
SP-332	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	8
SP-333	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	9
SP-334	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	10
SP-335	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	11
SP-336	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	12
SP-337	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -dieu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	13
SP-338	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	14
SP-342	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ .PEG3	15
SP-343	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ .PEG3	16
SP-344	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ .PEG3	17
SP-347	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ .PEG3	18
SP-348	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	19
SP-350	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	20
SP-352	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ .PEG3	21
SP-358	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -dAsp ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ .PEG3	22
SP-359	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -dAsp ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	23

(continuación)

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
SP-360	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ -PEG3	24
SP-361	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ -PEG3	25
SP-362	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	26
SP-368	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dNaI ¹⁶	27
SP-369	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	28
SP-370	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Asp[Lactam] ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Orn ¹⁵ -dieu ¹⁶	29
SP-371	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	30
SP-372	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	31
N1	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ -PEG3	32
N2	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	33
N3	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ -PEG3	34
N4	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ -PEG3	35
N5	C4:C12, C7:C15	PEG3-dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶	36
N6	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dieu ¹⁶ -PEG3	37
N7	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	38
N8	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶ -PEG3	39
N9	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	40
N10	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶ -PEG3	41
N11	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dSer ¹⁶ -PEG3	42
N12	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dSer ¹⁶	43
N13	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dSer ¹⁶ -PEG3	44
Fórmula I	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa ¹⁶	45
Fórmula II	C4:C12, C7:C15	Xaa _{1,1} -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa _{2,2} ¹⁶	46
Fórmula III	4:12, 7:15	Xaa _{1,1} -Maa ⁴ -Glu ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Maa ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Maa ¹⁵ -Xaa _{2,2} ¹⁶	47

{(continuación)}

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
Fórmula IV	4:12,7:15	Xaa ₁₁ -Maa ¹ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Maa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Maa ¹⁵ -Xaa ₂	48
Fórmula V	C4:C12,C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Asn ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa ¹⁶	49
Fórmula VI	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -X3 ⁸ -Asn ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	50
Fórmula VII	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -dGlu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Asn ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	51
Fórmula VII	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Asn ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	52
Fórmula VIII	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -dAsp ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Tyr ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	53
Fórmula IX	C4:C12,C7:C15	dAsn ¹ -dGlu ² -dGlu ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Cys ⁷ -Xaa ⁸ -Tyr ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -d-Xaa ¹⁶	54
Fórmula XXI	C4:C12,C7:C15	Xaa ₁₁ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Xaa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Xaa ¹⁵ -Xaa ₂ ¹⁶	250

Tabla II. Lináclotida y derivados

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
SP-339 (lináclotida)	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴	55
SP-340	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³	56
SP-349	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴ -PEG3	57
SP-353	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	58
SP-354	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	59
SP-355	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -dTyr ¹⁴	60
SP-357	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴	61
SP-374	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	62
SP-375	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	63
SP-376	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	64
SP-377	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	65
SP-378	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	66
SP-379	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	67
SP-380	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	68
SP-381	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	69
SP-382	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	70
SP-383	C3:C8, C4:C12, C7:15	dAsn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	71
SP-384	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴ -PEG3	72
N14	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -PEG3	73
N15	C1:C6, C2:C10, C5:13	PEG3-Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³	74
N16	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -PEG3	75
N17	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	76
N18	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	77

(continuación)

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
N19	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ser ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	78
N20	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	79
N21	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	80
N22	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	81
N23	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	82
N24	C3:C8, C4:C12, C7:15	PEG3-Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶	83
N25	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Asn ⁹ -Pro ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Tyr ¹⁶ -PEG3	84
N26	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Ser ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴	85
N27	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Phe ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³ -Tyr ¹⁴	86
N28	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Ser ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³	87
N29	C1:C6, C2:C10, C5:13	Cys ¹ -Cys ² -Glu ³ -Phe ⁴ -Cys ⁵ -Cys ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Cys ¹³	88
N30	1:6, 2:10, 5:13	Pen ¹ -Pen ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Pen ⁵ -Pen ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Pen ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Pen ¹³ -Tyr ¹⁴	89
N31	1:6, 2:10, 5:13	Pen ¹ -Pen ² -Glu ³ -Tyr ⁴ -Pen ⁵ -Pen ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Pen ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Pen ¹³	90
Fórmula X	C9:C14, C10:C18, C13:21	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Xaa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Asn ⁷ -Tyr ⁸ -Cys ⁹ -Cys ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Tyr ¹² -Cys ¹³ -Cys ¹⁴ -Xaa ¹⁵ -Xaa ¹⁶ -Xaa ¹⁷ -Cys ¹⁸ -Xaa ¹⁹ -Xaa ²⁰ -Cys ²¹ -Xaa ²²	91
Fórmula XI	C9:C14, C10:C18, C13:21	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Xaa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Asn ⁷ -Phe ⁸ -Cys ⁹ -Cys ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Phe ¹² -Cys ¹³ -Cys ¹⁴ -Xaa ¹⁵ -Xaa ¹⁶ -Xaa ¹⁷ -Cys ¹⁸ -Xaa ¹⁹ -Xaa ²⁰ -Cys ²¹ -Xaa ²²	92
Fórmula XII	C3:C8, C4:C12, C7:15	Asn ¹ -Phe ² -Cys ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Cys ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa ¹⁶	93
Fórmula XIII	3:8, 4:12, C:15	Asn ¹ -Phe ² -Pen ³ -Cys ⁴ -Xaa ⁵ -Phe ⁶ -Cys ⁷ -Pen ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Cys ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Xaa ¹⁶	94
Fórmula XIV	3:8, 4:12, 7:15	Asn ¹ -Phe ² -Maa ³ -Maa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Maa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Maa ¹⁵ -Xaa ¹⁶	95
Fórmula XV	1:6, 2:10, 5:13	Maa ¹ -Maa ² -Glu ³ -Xaa ⁴ -Maa ⁵ -Maa ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Maa ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Maa ¹³ -Tyr ¹⁴	96

(continuación)

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO.
Fórmula XVI	1:6, 2:10, 5:13	Maa ¹ -Maa ² -Glu ³ -Xaa ⁴ -Maa ⁵ -Maa ⁶ -Asn ⁷ -Pro ⁸ -Ala ⁹ -Maa ¹⁰ -Thr ¹¹ -Gly ¹² -Maa ¹³ .	97
Fórmula XVII	1:6, 2:10, 5:13	Xaa ₁₀₃ -Maa ¹ -Maa ² -Xaa ³ -Xaa ⁴ -Maa ⁵ -Maa ⁶ -Xaa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Maa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Xaa ¹² -Maa ¹³ -Xaa ₁₀₂	98

Tabla III. Péptidos GCRA

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO:
SP-363	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu- AMIDE ¹⁶	99
SP-364	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dSer ¹⁶	100
SP-365	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dSer- AMIDE ¹⁶	101
SP-366	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dTyr ¹⁶	102
SP-367	C4:C12, C7:C15	dAsn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dPyr- AMIDE ¹⁶	103
SP-373	C4:C12, C7:C15	Pyglu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -dLeu- AMIDE ¹⁶	104
/	C4:C12, C7:C15	Pyglu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	251
SP-304 di PEG	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶ - PEG3	105
SP-304 N- PEG	C4:C12, C7:C15	PEG3-Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	106
SP-304 C- PEG	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶ -PEG3	107

Tabla IV. Análogos de SP-304, uroguantiina y análogos de uroguantiina

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
Fórmula XVIII	C4:C12, C7:C15	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Xaa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Maa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Maa ¹⁵ -Xaa ¹⁶	108
Uroguantiina	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	109
N32	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	110
N33	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	111
N34	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	112
N35	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	113
N36	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	114
N37	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	115
N38	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	116
N39	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	117
N40	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	118
N41	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	119
N42	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	120
N43	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	121
N44	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	122
N45	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	123
N46	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	124
N47	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	125
N49	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	126
N49	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	127
N50	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	128
N51	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	129
N52	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	130
N53	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	131

(continuación)

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
N54	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	132
N55	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	133
N56	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	134
N57	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	135
N58	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	136
N59	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	137
N60	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	138
N61	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	139
N62	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	140
N63	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Val ⁸ -Asn ⁹ -Val ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	141
N65	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	142
N66	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	143
N67	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	144
N68	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	145
N69	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	146
N70	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	147
N71	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	148
N72	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	149
N73	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	150
N74	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	151
N75	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	152
N76	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	153
N77	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	154
N78	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	155

(continuación)

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
N79	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	156
N80	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Leu ¹⁶	157
N81	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	158
N92	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	159
N83	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	160
N94	C4:C12, C7:C15	Glu ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	161
N95	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	162
N96	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	163
N87	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	164
N88	C4:C12, C7:C15	Asp ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	165
N99	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	166
N90	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	167
N91	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	168
N92	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	169
N93	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	170
N94	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	171
N95	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	172
N96	C4:C12, C7:C15	Lys ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	173

Tabla V. Guanilina y análogos

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
Fórmula XIX	4:12, 7:15	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Maa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Xaa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Maa ¹⁵	174
Guanilina	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Phe ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	175
Guanilina humana	C4:C12, C7:C15	Pro ¹ -Gly ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Tyr ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	252
N97	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	176
N99	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	177
N99	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	178
N100	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	179
N101	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	180
N102	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	181
N103	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	182
N104	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	183
N105	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	184
N106	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	185
N107	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	186
N108	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	187
N109	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	188
N110	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	189
N111	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	190
N112	C4:C12, C7:C15	Ser ¹ -His ² -Thr ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	191
N113	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	192
N114	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	193
N115	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	194
N116	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	195

(continuación)

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
N117	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	196
N118	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	197
N119	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	198
N120	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	199
N121	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	200
N122	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	201
N123	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	202
N124	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	203
N125	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	204
N126	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	205
N127	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Val ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	206
N129	C4:C12, C7:C15	Asn ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ala ⁸ -Asn ⁹ -Ala ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Ala ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵	207

Tabla VI. Linfoguaniilina y análogos

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
Fórmula XX	4:12,7:15	Xaa ¹ -Xaa ² -Xaa ³ -Xaa ⁴ -Xaa ⁵ -Xaa ⁶ -Maa ⁷ -Xaa ⁸ -Xaa ⁹ -Xaa ¹⁰ -Xaa ¹¹ -Maa ¹² -Xaa ¹³ -Xaa ¹⁴ -Xaa ¹⁵	208
Linfoguaniilina	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Leu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	209
N129	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	210
N130	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	211
N131	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	212
N132	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	213
N133	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	214
N134	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	215
N135	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	216
N136	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	217
N137	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	218
N138	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	219
N139	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	220
N140	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	221
N141	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	222
N142	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	223
N143	C4:C12	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	224
N144	C4:C12	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Tyr ¹⁵	225
N145	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	226
N146	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	227
N147	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	228
N148	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Thr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	229
N149	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	230

(continuación)

Nombre	Posición de los enlaces disulfuro	Estructura	SEQ ID NO
N150	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	231
N151	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	232
N152	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Glu ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	233
N153	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	234
N154	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	235
N155	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	236
N156	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Tyr ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	237
N157	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	239
N158	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Glu ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	239
N159	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Asp ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	240
N160	C4:C12, C7:C15	Gln ¹ -Glu ² -Asp ³ -Cys ⁴ -Glu ⁵ -Ile ⁶ -Cys ⁷ -Ile ⁸ -Asn ⁹ -Met ¹⁰ -Ala ¹¹ -Cys ¹² -Thr ¹³ -Gly ¹⁴ -Cys ¹⁵ -Ser ¹⁶	241

Tabla VII. Péptido ST y análogos

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

1.2 Métodos de uso

La divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir trastornos gastrointestinales y aumentar la motilidad gastrointestinal en un sujeto que lo necesita mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un agonista de GCC o una formulación del mismo. Los ejemplos no limitantes de trastornos gastrointestinales que se pueden tratar o prevenir de acuerdo con los métodos de la divulgación incluyen síndrome del intestino irritable (SII), dispepsia no ulcerosa, úlceras relacionadas con la infección por *H. pylori*, pseudo-obstrucción intestinal crónica, dispepsia funcional, pseudo-obstrucción colónica, reflujo duodenogástrico, enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), íleo (por ejemplo, íleo posoperatorio), gastroparesia, acidez estomacal (alta acidez en el tubo GI), estreñimiento (por ejemplo, estreñimiento asociado con el uso de medicamentos tales como opiáceos, fármacos para la osteoartritis o fármacos para la osteoporosis); estreñimiento posquirúrgico, estreñimiento asociado con trastornos neuropáticos, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

La divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir el trastorno de la motilidad gastrointestinal, síndrome de intestino irritable, un trastorno gastrointestinal funcional, enfermedad de reflujo gastroesofágico, reflujo duodenogástrico, acidez funcional, dispepsia, dispepsia funcional, dispepsia no ulcerosa, gastroparesia, pseudo-obstrucción intestinal crónica, pseudo-obstrucción colónica, obesidad, insuficiencia cardíaca congestiva o hiperplasia prostática benigna.

La divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir el estreñimiento y/o aumentar la motilidad gastrointestinal en un sujeto que lo necesita mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un agonista de GCC o una formulación del mismo. Los criterios clínicamente aceptados que definen el estreñimiento van desde la frecuencia de las deposiciones, la consistencia de las heces y la facilidad de las deposiciones. Una definición común de estreñimiento es menos de tres deposiciones por semana. Otras definiciones incluyen heces anormalmente duras o defecación que requiere un esfuerzo excesivo (Schiller 2001 Aliment Pharmacol Ther 15:749-763). El estreñimiento puede ser idiopático (estreñimiento funcional o estreñimiento de tránsito lento) o secundario a otras causas, incluyendo trastornos neurológicos, metabólicos o endocrinos. Estos trastornos incluyen diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipocalcemia, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, lesiones de la médula espinal, neurofibromatosis, neuropatía autónoma, enfermedad de Chagas, enfermedad de Hirschsprung y fibrosis quística. El estreñimiento también puede ser el resultado de una cirugía o debido al uso de fármacos, tales como analgésicos (como opiáceos), antihipertensivos, anticonvulsivos, antidepresivos, antiespasmódicos y antipsicóticos.

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

La divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir el estreñimiento idiopático crónico y aumentar la motilidad gastrointestinal en un sujeto que lo necesita mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un agonista de GCC o una formulación del mismo.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a una reducción, una mejora parcial, una mejora o una mitigación de al menos un síntoma clínico asociado con los trastornos gastrointestinales que se están tratando. El término "prevenir" se refiere a una inhibición o retraso en la aparición o progresión de al menos un síntoma clínico asociado con los trastornos gastrointestinales que se van a prevenir. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que proporciona cierta mejora o beneficio al sujeto. En determinadas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad que proporciona un cierto alivio, mitigación y/o disminución de al menos un síntoma clínico del trastorno gastrointestinal que se va a tratar. En otras realizaciones, la cantidad eficaz es la cantidad que proporciona cierta inhibición o retraso en la aparición o progresión de al menos un síntoma clínico asociado con el trastorno gastrointestinal que se va a prevenir. Los efectos terapéuticos no tienen por qué ser completos ni curativos, siempre y cuando se brinde algún beneficio al sujeto. El término "sujeto" se refiere preferentemente a un sujeto humano pero también puede referirse a un primate no humano u otro mamífero seleccionado preferentemente entre un ratón, una rata, un perro, un gato, una vaca, un caballo o un cerdo.

La divulgación también proporciona métodos para tratar el cáncer gastrointestinal en un sujeto que lo necesita mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un agonista de GCC o una formulación del mismo. Los ejemplos no limitantes de cánceres gastrointestinales que se pueden tratar de acuerdo con los métodos de la divulgación incluyen cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de intestino, cáncer de ano, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar o cáncer de colon.

La divulgación también proporciona métodos para tratar trastornos del metabolismo de los lípidos, trastornos biliares,

trastornos inflamatorios, trastornos pulmonares, cáncer, trastornos cardíacos incluyendo trastornos cardiovasculares, trastornos oculares, trastornos bucales, trastornos de la sangre, trastornos hepáticos, trastornos de la piel, trastornos de la próstata, trastornos endocrinos y obesidad.

5 Los trastornos del metabolismo de los lípidos incluyen, pero sin limitación, dislipidemia, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, sitosterolemia, hipercolesterolemia hereditaria, xantoma, hiperlipidemia combinada, deficiencia de lecitina colesterol aciltransferasa, enfermedad de Tangier, abetalipoproteinemia, disfunción eréctil, esteatosis hepática y hepatitis.

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

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

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

25 El cáncer incluye carcinogénesis de tejidos y órganos incluyendo metástasis tales como, por ejemplo, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de intestino, cáncer de ano, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar o cáncer de colon; cáncer de pulmón; cáncer de tiroides; cáncer de piel (por ejemplo, melanoma); cáncer oral; cáncer del tracto urinario (por ejemplo, cáncer de vejiga o cáncer de riñón); cáncer de la sangre (por ejemplo, mieloma o leucemia) o cáncer de próstata.

30 Los trastornos cardíacos incluyen, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva, taquicardia, hipertensión, colesterol alto o triglicéridos altos. Los trastornos cardiovasculares incluyen, por ejemplo, aneurisma, angina de pecho, aterosclerosis, accidente cerebrovascular (ictus), enfermedad cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, arteriopatía coronaria, infarto de miocardio (ataque cardíaco) o enfermedad vascular periférica.

35 Los trastornos hepáticos incluyen, por ejemplo, cirrosis y fibrosis. Además, el agonista de GC-C también puede ser útil para facilitar la regeneración hepática en pacientes con trasplante de hígado. Los trastornos oculares incluyen, por ejemplo, aumento de la presión intraocular, glaucoma, xeroftalmia, degeneración retiniana, trastornos de las glándulas lagrimales o inflamación ocular. Los trastornos de la piel incluyen, por ejemplo, xerosis. Los trastornos bucales incluyen, por ejemplo, sequedad en la boca (xerostomía), síndrome de Sjögren, enfermedades de las encías (por ejemplo, enfermedad periodontal) o bloqueo o mal funcionamiento del conducto de las glándulas salivales. Los trastornos de la próstata incluyen, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna (HPB). Los trastornos endocrinos incluyen, por ejemplo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, hipotiroidismo y fibrosis quística.

40 1.2.1 Dosis terapéuticamente eficaces

45 Los trastornos se tratan, se previenen o se alivian administrando a un sujeto, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano que lo necesite, una dosis terapéuticamente eficaz de un péptido agonista de GCC. La presente divulgación se basa en parte en los resultados inesperados de ensayos clínicos en seres humanos que demostraron que las formulaciones de la divulgación son terapéuticamente eficaces en dosis mucho más bajas que las predichas según los estudios en animales. De acuerdo con un aspecto de la divulgación, la dosis terapéuticamente eficaz está entre 0,01 miligramos (mg) y 10 mg por dosis unitaria. El término "dosis unitaria" se refiere a una única entidad de suministro farmacológico, por ejemplo, un comprimido, cápsula, solución, inhalación, formulación de liberación controlada o de liberación prolongada (por ejemplo, tecnología MMX® de Cosmo Pharmaceuticals). En una realización, la dosis eficaz está entre 0,01 mg y 9 mg. En otra realización, la dosis eficaz está entre 0,01 mg y 5 mg. En otra realización, la dosis eficaz está entre 0,01 mg y 3 mg. En otra realización, la dosis eficaz está entre 0,10 mg y 5 mg. En otra realización, la dosis eficaz está entre 0,10 mg y 3 mg. En una realización, la dosis unitaria es 0,01 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,5 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 5 mg o 10 mg. En una realización, la dosis unitaria es 0,3 mg, 1,0 mg, 3,0 mg, 9,0 mg o 9,5 mg.

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

Los agonistas de GCC para su uso en los métodos descritos anteriormente se administran preferentemente por vía oral. Las formas farmacéuticas incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos y cápsulas.

65 La dosis diaria total se puede administrar al paciente en una dosis única o en múltiples subdosis. Típicamente, las

subdosis se pueden administrar de dos a seis veces al día, preferentemente de dos a cuatro veces al día, e incluso más preferentemente de dos a tres veces al día. Preferentemente, se administra una única dosis diaria.

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

El tratamiento combinado se puede lograr administrando dos o más agentes, por ejemplo, un péptido agonista de GCC descrito en el presente documento y otro compuesto, cada uno de los cuales se formula y se administra por separado, o administrando dos o más agentes en una única formulación. También se abarcan otras combinaciones en la terapia combinada. Por ejemplo, se pueden formular dos agentes juntos y administrarse conjuntamente con una formulación separada que contenga un tercer agente. Aunque los dos o más agentes en la terapia combinada se pueden administrar simultáneamente, no es necesario. Por ejemplo, la administración de un primer agente (o combinación de agentes) puede preceder a la administración de un segundo agente (o combinación de agentes) en minutos, horas, días o semanas. Por lo tanto, los dos o más agentes se pueden administrar con una diferencia de minutos entre sí o con 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 o 24 horas entre sí o con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 días entre sí o con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 semanas entre sí. En algunos casos son posibles incluso intervalos más largos. Aunque en muchos casos es deseable que dos o más agentes usados en la terapia combinada estén presentes en el cuerpo del paciente al mismo tiempo, esto no es necesario.

Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento pueden combinarse con inhibidores de la fosfodiesterasa, por ejemplo, sulindac sulfona, zaprinast, sildenafil, vardenafilo o tadalafilo para mejorar aún más los niveles de cGMP en los tejidos u órganos diana.

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

1.2.2 Agentes de ejemplo para terapia combinada

Las formulaciones de agonistas de GCC pueden administrarse solas o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno gastrointestinal. La formulación de agonista de GCC puede comprender uno o más agentes terapéuticos adicionales. El agonista de GCC puede formularse por separado del uno o más agentes terapéuticos adicionales. El agonista de GCC puede administrarse de forma simultánea, secuencial o en un momento diferente al del uno o más agentes terapéuticos adicionales. La formulación de agonista de GCC puede administrarse junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de la fosfodiesterasa, nucleótidos cíclicos (tales como cGMP y cAMP), un laxante (tal como SENNA o METAMUCIL), un ablandador de heces, un terapia con factor de necrosis alfa antitumoral para la EII (tales como REMICADE, ENBREL o HUMIRA) y fármacos antiinflamatorios (tales como inhibidores de COX-2, sulfasalazina, derivados de 5-ASA y AINE). La formulación de agonista de GCC puede administrarse junto con una dosis eficaz de un inhibidor de la fosfodiesterasa específica de cGMP (cGMP-PDE) de forma simultánea o secuencial con dicho agonista de GCC. Los inhibidores de cGMP-PDE incluyen, por ejemplo, suldinac sulfona, zaprinast, motapizona, vardenifilo y sildenafil. La formulación de agonista de GCC puede administrarse junto con inhibidores de transportadores de nucleótidos cíclicos. En las siguientes secciones se proporcionan ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden administrarse junto con formulaciones de agonistas de GCC.

1.2.2.1 Agentes para tratar cánceres gastrointestinales

Las formulaciones de agonistas de GCC se pueden usar junto con uno o más agentes antitumorales, incluyendo pero sin limitación, agentes alquilantes, epipodofilotoxinas, nitrosoureas, antimetabolitos, alcaloides de la vinca, antibióticos de antraciclina, agentes de mostaza nitrogenada y similares. Los agentes antitumorales particulares incluyen tamoxifeno, taxol, etopósido y 5-fluorouracilo. Pueden usarse formulaciones de agonistas de GCC junto con un agente antivírico o un anticuerpo monoclonal.

Los ejemplos no limitantes de agentes antitumorales que se pueden usar junto con formulaciones de agonistas de GCC para el tratamiento del cáncer de colon incluyen agentes antiproliferativos, agentes para la modificación o reparación del ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, reguladores de la transcripción de ADN/ARN, inhibidores del procesamiento de ARN, agentes que afectan a la expresión, síntesis y estabilidad de proteínas, agentes que afectan

a la localización de las proteínas o su capacidad para ejercer su acción fisiológica, agentes que interfieren con las interacciones proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, agentes que actúan por interferencia de ARN, moléculas de unión al receptor de cualquier naturaleza química (incluidas moléculas pequeñas y anticuerpos), toxinas dirigidas, activadores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, reguladores génicos, inhibidores de HSP-90, moléculas que interfieren con los microtúbulos u otros componentes citoesqueléticos o la adhesión y motilidad celular, agentes para fototerapia y complementos terapéuticos.

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

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

Los inhibidores de la síntesis de ADN representativos incluyen (+-)-ametofterina (metotrexato), 1,4-dióxido de 3-amino-1,2,4-benzotriazina, aminopterina, citosina b-D-arabinofuranósido (Ara-C), clorhidrato de citosina b-D-arabinofuranósido (Ara-C), 2-fluoroadenina-9-b-D-arabinofuranósido (desfosfato de fludarabina; F-ara-A), 5-fluoro-5'-desoxiuridinc, 5-fluorouracilo, ganciclovir, hidroxiurea, 6-mercaptopurina y 6-tioguanina.

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

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

Los reguladores génicos representativos incluyen 5-aza-2'-desoxicitidina, 5-azacitidina, colecalciferol (vitamina D₃), ciglitazona, acetato de ciproterona, 15-desoxi-D_{12,14}-prostaglandina J₂, epitestosterona, flutamida, sal de amonio del ácido glicirrónico (glicirricina), 4-hidroxitamoxifeno, mifepristona, clorhidrato de procainamida, clorhidrato de raloxifeno, todo *trans*-retinal (aldehído de vitamina A), ácido retinoico (ácido de vitamina A), ácido 9-cis-retinoico, ácido 13-cis-retinoico, p-hidroxianilida del ácido retinoico, retinol (vitamina A), tamoxifeno, sal de citrato de tamoxifeno, ácido tetradeciltioacético y troglitazona.

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

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

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

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

Los agentes también pueden ser agentes anti VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), tal como se conocen en la técnica. Actualmente se encuentran en ensayos clínicos o se han aprobado varios anticuerpos y moléculas pequeñas que funcionan inhibiendo VEGF, tales como Avastin (bevacizumab), SU5416, SU11248 y BAY 43-9006. Los agentes también pueden dirigirse contra receptores de factores de crecimiento tales como los de la familia EGF/Erb-B, tal como el receptor de EGF (Iressa o Gefitinib, y Tarceva o Erlotinib), receptor Erb-B2 (Herceptin o Trastuzumab), otros receptores (tales como Rituximab o Rituxan/MabThera), tirosina cinasas, tirosina cinasas no receptoras, serina/treonina cinasas celulares (incluyendo MAP cinasas) y diversas otras proteínas cuya desregulación contribuye a la oncogénesis (tales como proteínas G pequeñas/de la familia Ras y las grandes/heterotriméricas). Varios anticuerpos y moléculas pequeñas que se dirigen a estas moléculas se encuentran actualmente en diversas etapas de desarrollo (incluidas las aprobadas para tratamiento o en ensayos clínicos).

Una formulación de agonista de GCC se puede combinar con uno o más agentes antitumorales seleccionados del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, tamoxifeno, vinorelbina, gemcitabina, cisplatino, etopósido, topotecán, irinotecán, anastrozol, rituximab, trastuzumab, fludarabina, ciclofosfamida, gentuzumab, carboplatino, interferones y

doxorubicina. En una realización particular, el agente antitumoral es paclitaxel. En una realización adicional, el método comprende además un agente antitumoral seleccionado del grupo que consiste en 5-FU, doxorubicina, vinorelbina, citoxano y cisplatino.

5 1.2.2.2 Agentes que tratan la enfermedad de Crohn

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

15 1.2.2.3 Agentes que tratan la colitis ulcerosa

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

1.2.2.4 Agentes que tratan el estreñimiento/síndrome del intestino irritable

Una formulación de agonista de GCC de la divulgación puede formar parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento del estreñimiento, tal como la asociada con el síndrome del intestino irritable. Los ejemplos no limitantes del uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen laxantes tales como SENNA, MIRALAX, lactulosa, PEG o policarbófilo de calcio), ablandadores de heces (tales como aceite mineral o COLACE), agentes de carga (tales como METAMUCIL o salvado), agentes tales como ZELNORM (también llamado tegaserod) y medicamentos anticolinérgicos tales como BENTYL y LEVSIN.

1.2.2.5 Agentes para el tratamiento del íleo posoperatorio

Una formulación de agonista de GCC de la divulgación puede formar parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento del íleo postoperatorio. Los ejemplos no limitantes del uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen ENTEREG (alvimopán; anteriormente llamado ado lor/ADL 8-2698), conivaptán y agentes relacionados descritos en el documento US 6.645.959.

1.2.2.6 Agentes contra la obesidad

Una formulación de agonista de GCC de la divulgación puede formar parte de una terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la obesidad. Los ejemplos no limitantes del uno o más agentes terapéuticos adicionales incluyen inhibidores de 11 β HSD-1 (11-beta hidroxiesteroide 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]anuleno, y los compuestos divulgados en los documentos WO01/90091, WO01/90090, WO01/90092 y WO02/072084; antagonistas de 5HT tales como los de los documentos WO03/037871, WO03/037887 y similares; moduladores de 5HT1a tales como carbidopa, benserazida y los divulgados en los documentos US6207699, WO03/031439 y similares; agonistas de 5HT2c (receptor 2c de serotonina), tales como BVT933, DPCA37215, IK264, PNU 22394, WAY161503, R-1065, SB 243213 (Glaxo Smith Kline) e YM 348 y los divulgados en los documentos US3914250, WO00/77010, WO02/36596, WO02/48124, WO02/10169, WO01/66548, WO02/44152, WO02/51844, WO02/40456 y WO02/40457; moduladores del receptor 5HT6, tales como los de los documentos WO03/030901, WO03/035061, WO03/039547 y similares; acil-estrógenos, tales como oleoil-estrona, divulgada en del Mar-Grasa, M. *et al*, Obesity Research, 9:202-9 (2001) y la Solicitud de Patente Japonesa N.º JP 2000256190; compuestos bicíclicos anorexígenos tales como 1426 (Aventis) y 1954 (Aventis), y los compuestos divulgados en los documentos WO00/18749, WO01/32638, WO01/62746, WO01/62747 y WO03/015769; antagonistas/agonistas inversos de CB 1 (receptor cannabinoide 1) tales como rimonabant (Acomplia; Sanofi), SR-147778 (Sanofi), SR-141716 (Sanofi), BAY 65-2520 (Bayer) y SLV 319 (Solvay), y los divulgados en las publicaciones de patente US4973587, US5013837, US5081122, US5112820, US5292736, US5532237, US5624941, US6028084, US6509367, US6509367, WO96/33159, WO97/29079, WO98/31227, WO98/33765, WO98/37061, WO98/41519, WO98/43635, WO98/43636, WO99/02499, WO00/10967, WO00/10968, WO01/09120, WO01/58869, WO01/64632, WO01/64633, WO01/64634,

WO01/70700, WO01/96330, WO02/076949, WO03/006007, WO03/007887, WO03/020217, WO03/026647, WO03/026648, WO03/027069, WO03/027076, WO03/027114, WO03/037332, WO03/040107, WO03/086940, WO03/084943 y EP658546; agonistas de CCK-A (colecistocinina-A), tales como AR-R 15849, GI 181771 (GSK), JMV-180, A-71378, A-71623 y SR146131 (Sanofi), y los descritos en el documento US5739106; 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 divulgados en los documentos WO94/09134, WO98/22128 y WO99/43813; inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (DP-IV), tales como isoleucina tiazolidida, valina pirrolidida, NVP-DPP728, LAF237, P93/01, P 3298, TSL 225 (ácido triptofil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico; divulgado por Yamada *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 8 (1998) 1537-1540), TMC-2A/2B/2C, inhibidores de CD26, FE 999011, P9310/K364, VIP 0177, SDZ 274-444, 2-cianopirrolididas y 4-cianopirrolididas como se divulga por Ashworth *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 6, N.º 22, págs. 1163-1166 y 2745-2748 (1996) y los compuestos divulgados en las publicaciones patente. WO99/38501, WO99/46272, WO99/67279 (Probiobug), WO99/67278 (Probiobug), WO99/61431 (Probiobug), WO02/083128, WO02/062764, WO03/000180, WO03/000181, WO03/000250, WO03/002530, WO03/002553, WO03/002593, WO03/004498, WO03/004496, WO03/017936, WO03/024942, WO03/024965, WO03/033524, WO03/037327 y EP1258476; agonistas/antagonistas del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento, tales como NN703, hexarelina, MK-0677 (Merck), SM-130686, CP-424391 (Pfizer), LY 444.711 (Eli Lilly), L-692.429 y L-163.255, y tales como los divulgados en el documento USSN 09/662448, solicitud provisional de EE.UU. 60/203335, US6358951, US2002049196, US2002/022637, WO01/56592 y WO02/32888; antagonistas/agonistas inversos de H3 (histamina H3), tales como tioperamida, N-(4-pentenil)carbamato de 3-(1H-imidazol-4-il)propilo, clobenpropit, yodofenpropit, imoproxifán, GT2394 (Gliatech) y A331440, O-[3-(1H-imidazol-4-il)propanol]carbamatos (Kiec-Kononowicz, K. *et al.*, Pharmazie, 55:349-55 (2000)), antagonistas del receptor de histamina H3 que contienen piperidina (Lazewska, D. *et al.*, Pharmazie, 56:927-32 (2001), derivados de benzofenona y compuestos relacionados (Sasse, A. *et al.*, Arch. Pharm. (Weinheim) 334:45-52 (2001)), N-fenilcarbamatos sustituidos (Reidemeister, S. *et al.*, Pharmazie, 55:83-6 (2000)) y derivados de proxifano (Sasse, A. *et al.*, J. Med. Chem. 43:3335-43 (2000)) y moduladores del receptor de histamina H3 tales como los divulgados en los documentos WO02/15905, WO03/024928 y WO03/024929; derivados de leptina, tales como los divulgados en los documentos US5552524, US5552523, US5552522, US5521283, WO96/23513, WO96/23514, WO96/23515, WO96/23516, WO96/23517, WO96/23518, WO96/23519 y WO96/23520; leptina, incluyendo leptina humana recombinante (PEG-OB, Hoffman La Roche) y metionil leptina humana recombinante (Amgen); inhibidores de la lipasa, tales como 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 divulgados en las publicaciones de patente WO01/77094, US4598089, US4452813, USUS5512565, US5391571, US5602151, US4405644, US4189438 y US4242453; moduladores del metabolismo lipídico, tales como ácido maslínico, eritrodio, ácido ursólico uvaol, ácido betulínico, betulina y similares, y los compuestos divulgados en el documento WO03/011267; agonistas de Mc4r (receptor 4 de melanocortina), tales como CHIR86036 (Chiron), ME-10142, ME-10145 y HS-131 (Melacure), y los divulgados en las publicaciones PCT N.º WO99/64002, WO00/74679, WO01/991752, WO01/25192, WO01/52880, 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 5 de melanocortina), tales como los divulgados en los documentos WO97/19952, WO00/15826, WO00/15790, US20030092041; antagonistas del receptor de la hormona concentradora de melanina 1 (MCHR), tales como T-226296 (Takeda), SB 568849, SNP-7941 (Synaptic), y los divulgados en las publicaciones de patente WOO 1/21169, WO01/82925, WO01/87834, WO02/051809, WO02/06245, WO02/076929, WO02/076947, WO02/04433, WO02/51809, WO02/083134, WO02/094799, WO03/004027, WO03/13574, WO03/15769, WO03/028641, WO03/035624, WO03/033476, WO03/033480, JP13226269 y JP1437059; moduladores de mGluR5 tales como los divulgados en los documentos WO03/029210, WO03/047581, WO03/048137, WO03/051315, WO03/051833, WO03/053922, WO03/059904 y similares; agentes serotoninérgicos, tales como fenfluramina (tal como Pondimin® (bencenoetanamina, N-etil-alfa-metil-3-(trifluorometil)-, clorhidrato), Robbins), dexfenfluramina (tal como Redux® (bencenoetanamina, N-etil-alfa-metil-3-(trifluorometil)-, clorhidrato), Interneuron) y sibutramina ((Meridia®, Knoll/Reductil™) incluyendo mezcla racémicas, como isómeros (+) y (-) ópticamente puros, y sales farmacéuticamente aceptables, disolventes, hidratos, clatratos y profármacos de los mismos, incluyendo sales clorhidrato de sibutramina monohidrato de los mismos, y los compuestos divulgados en los documentos US4746680, US4806570 y US5436272, US20020006964, WO01/27068 y WO01/62341; inhibidores del transportador de NE (norepinefrina), tales como GW 320659, despiramina, talsupram y nomifensina; antagonistas de NPY 1, tales como BIBP3226, J-115814, BIBO 3304, LY-357897, CP-671906, GI-264879A y los divulgados en los documentos US6001836, WO96/14307, WO01/23387, WO99/51600, WO01/85690, WO01/85098, WO01/85173 y WO01/89528; antagonistas de NPY5 (neuropéptido Y Y5), tales como 152.804, GW-569180A, GW-594884A, GW-587081X, GW-548118X, FR235208, FR226928, FR240662, FR252384, 1229U91, GI-264879A, CGP71683A, LY-377897, LY-366377, PD-160170, SR-120562A, SR-120819A, JCF-104 y H409/22 y los compuestos divulgados en las publicaciones de patente US6140354, US6191160, US6218408, US6258837, US6313298, US6326375, US6329395, US6335345, US6337332, US6329395, US6340683, EP01010691, EP-01044970, WO97/19682, WO97/20820, WO97/20821, WO97/20822, WO97/20823, WO98/27063, WO00/107409, WO00/185714, WO00/185730, WO00/64880, WO00/68197, WO00/69849, WO01/13917, WO01/09120, WO01/14376, WO01/85174, 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 opioides, tales como nalmefeno (REVEX®), 3-metoxinaltrexona, metilnaltrexona, naloxona y naltrexona (por ejemplo, PT901; Pain Therapeutics, Inc.) y los divulgados en los documentos US20050004155 y WO00/21509; antagonistas de orexina, tales como SB-334867-A, y los divulgados en las publicaciones de patente WO01/96302, WO01/68609, WO02/44172, WO02/51232, WO02/51838, WO02/089800, WO02/090355, WO03/023561, WO03/032991 y WO03/037847; inhibidores de PDE (por ejemplo, compuestos que ralentizan la degradación de AMP cíclico (cAMP) y/o GMP cíclico (cGMP) mediante la inhibición de las fosfodiesterasas, lo que puede conducir a un aumento relativo en la concentración intracelular de cAMP y cGMP; los posibles inhibidores de la PDE son principalmente aquellas sustancias que se incluyen en la clase formada por los inhibidores de PDE3, la clase que consiste en los inhibidores de PDE4 y/o la clase que consiste en los inhibidores de PDE5, en particular aquellas sustancias que pueden designarse como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4 o como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4/5) tales como las descritas 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, EP0112987, EP0116948, EP0150937, EP0158380, EP0161632, EP0161918, EP0167121, EP0199127, EP0220044, EP0247725, EP0258191, EP0272910, EP0272914, EP0294647, EP0300726, EP0335386, EP0357788, EP0389282, EP0406958, EP0426180, EP0428302, EP0435811, EP0470805, EP0482208, EP0490823, EP0506194, EP0511865, EP0527117, EP0626939, EP0664289, EP0671389, EP0685474, EP0685475, EP0685479, JP92234389, JP94329652, JP95010875, US4963561, US5141931, WO9117991, WO9200968, WO9212961, WO9307146, WO9315044, WO9315045, WO9318024, WO9319068, WO9319720, WO9319747, WO9319749, WO9319751, WO9325517, WO9402465, WO9406423, WO9412461, WO9420455, WO9422852, WO9425437, WO9427947, WO9500516, WO9501980, WO9503794, WO9504045, WO9504046, WO9505386, WO9508534, WO9509623, WO9509624, WO9509627, WO9509836, WO9514667, WO9514680, WO9514681, WO9517392, WO9517399, WO9519362, WO9522520, WO9524381, WO9527692, WO9528926, WO9535281, WO9535282, WO9600218, WO9601825, WO9602541, WO9611917, DE3142982, DE116676, DE2162096, EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345 US6331543, US20050004222 (incluyendo los divulgados en las fórmulas I-XIII y los párrafos 37-39, 85-0545 y 557-577), WO9307124, EP0163965, EP0393500, EP0510562, EP0553174, WO9501338 y WO9603399, así como inhibidores de PDE5 (tales como RX-RA-69, SCH-51866, KT-734, vesnarinona, zaprinast, SKF-96231, ER-21355, BF/GP-385, NM-702 y sildenafil (Viagra™)), inhibidores de PDE4 (tales como etazolato, ICI63197, RP73401, imazolidinona (RO-20-1724), MEM 1414 (R1533/R1500; Pharmacia Roche), denbufilina, rolipram, oxagrelato, nitracuazona, Y-590, DH-6471, SKF-94120, motapizona, lixazinona, indolidano, olprinona, atizoram, KS-506-G, dipamfilina, BMY-43351, atizoram, arofilina, filaminast, PDB-093, UCB-29646, CDP-840, SKF-107806, piclamilast, RS-17597, RS-25344-000, SB-207499, TIBENELAST, SB-210667, SB-211572, SB-211600, SB-212066, SB-212179, GW-3600, CDP-840, mopidamol, anagrelida, ibudilast, amrinona, pimobendán, cilostazol, cuazinona y N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxibenzamida, inhibidores de PDE3 (tales como ICI153, 100, bemorandano (RWJ 22867), MCI-154, UD-CG212, sulmazol, ampizona, cilostamida, carbazerano, piroximona, imazodán, CI-930, siguzodán, adibendán, saterinona, SKF-95654, SDZ-MKS-492, 349-U-85, emoradán, EMD-53998, EMD-57033, NSP-306, NSP-307, revizinona, NM-702, WIN-62582 y WIN-63291, enoximona y milrinona, inhibidores de 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 vardenafilo (Levitra®); los agonistas del neuropéptido Y2 (NPY2) incluyen, pero sin limitación: el polipéptido YY y fragmentos y variantes del mismo (por ejemplo, YY3-36 (PYY3-36) (N. Engl. J. Med. 349:941, 2003; IKPEAPGE DASPEELNRY YASLRHYLNL VTRQRY (SEQ ID NO:XXX)) y agonistas de PYY tales como los divulgados en los documentos WO02/47712, WO03/026591, WO03/057235 y WO03/027637; inhibidores de la recaptación de serotonina, tales como, paroxetina, fluoxetina (Prozac™), fluvoxamina, sertralina, citalopram y imipramina, y los divulgados en los documentos US6162805, US6365633, WO03/00663, WO01/27060 y WO01/162341; agonistas β de la hormona tiroidea, tales como KB-2611 (KaroBioBMS), y los divulgados en los documentos WO02/15845, WO97/21993, WO99/00353, GB98/284425, Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 60/183.223 y Solicitud de Patente Japonesa N.º JP 2000256190; UCP-I (proteína de desacoplamiento 1), 2 o 3 activadores, tales como ácido fitánico, ácido 4-[(E)-2-(5, 6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-1-propenil]benzoico (TTNPB), ácido retinoico, y los divulgados en el documento WO99/00123; agonistas β_3 (receptor 3 beta adrenérgico), 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 (Nissin Kyorin), LY-377604 (Lilly), SR 59119A, y los divulgados en los documentos US5541204, US5770615, US5491134, US5776983, US488064, US5705515, US5451677, WO94/18161, WO95/29159, WO97/46556, WO98/04526 y WO98/32753, WO01/74782, WO02/32897, WO03/014113, WO03/016276, WO03/016307, WO03/024948, WO03/024953 y WO03/037881; agentes noradrenérgicos, incluyendo, pero sin limitación, dietilpropión (tal como Tenuate® (1-propanona, 2-(dietilamino)-1-fenil-, clorhidrato), Merrell), dextroanfetamina (también conocida como sulfato de dextroanfetamina, dexanfetamina, dexedrina, Dexampex, Ferndex, Oxydess II, Robese, Spancap n.º 1), mazindol ((o 5-(p-clorofenil)-2,5-dihidro-3H-imidazo[2,1-a]isoidol-5-ol) tal como Sanorex®, Novartis o Mazanor®, Wyeth Ayerst), fenilpropanolamina (o benzenometanol, alfa-(1-aminoetil)-, clorhidrato), fentermina ((o fenol, 3-[[4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)etil](4-metilfenil-1)amino], monoclóhidrato) tal como Adipex-P®, Lemmon, FASTIN®, SmithKline Beecham y Ionamin®, Medeva), fendimetrazina ((o L-(+)-tartrato de (2S,3S)-3,4-dimetil-2-fenilmorfolina (1:1)) tal como Metra® (Forest), Plegine® (Wyeth-Ayerst), Prelu-2® (Boehringer Ingelheim) y Statobex® (Lemmon), tartrato de fendamina (tal como Thephorin® (L-(+)-tartrato de 2,3,4,9-tetrahidro-2-

metil-9-fenil-1H-indenol[2,1-c]piridina (1:1)), Hoffmann-LaRoche), metanfetamina (tal como Desoxyn®, Abbot (clorhidrato de (S)-N,(alfa)-dimetilbencenoetanamina)), y tartrato de fendimetrazina (tal como cápsulas de liberación lenta Bontril®, Amarin (tartrato de 3,4-dimetil-2-fenilmorfolina); reguladores positivos/inductores de la oxidación de ácidos grasos, tales como Famoxin® (Genset); inhibidores de monamina oxidasa, incluyendo, pero sin limitación, befloxatona, moclobemida, brofaromina, fenoxatina, esuprona, befol, toloxatona, pirlindol, amiflamina, sercloremina, bazinaprina, lazabemida, milacemida, caroxazona y determinados otros compuestos como se divulga por el documento WO01/12176; y otros agentes contra la obesidad, tales como agonistas de 5HT-2, inhibidores de ACC (acetil-CoA carboxilasa), tales como los del documento WO03/072197, ácido alfa-lipoico (alfa-LA), AOD9604, supresores del apetito, tales como los del documento WO03/40107, ATL-962 (Alizyme PLC), benzocaína, clorhidrato de benzfetamina (Didrex), fucus (*fucus vesiculosus*), agonistas de BRS3 (receptor de bombesina subtipo 3), bupropión, cafeína, agonistas de CCK, quitosano, cromo, ácido linoleico conjugado, agonistas de la hormona liberadora de corticotropina, deshidroepiandrosterona, inhibidores de DGAT1 (diacilglicerol aciltransferasa 1), inhibidores de DGAT2 (diacilglicerol aciltransferasa 2), inhibidores del transportador de dicarboxilato, efedra, exendina 4 (un inhibidor de glp-1), inhibidores de FAS (sintasa de ácidos grasos) (tales como Cerulenin y C75), inhibidores de la resorción de grasas (tales como los del documento WO03/053451, y similares), inhibidores del transportador de ácidos grasos, fibras naturales solubles en agua (tales como psyllium, plantago, goma guar, avena, pectina), antagonistas de galanina, galega (ruda de cabra, lila francesa), tamarindo malabar, zamarrilla (*teucrium chamaedrys*), anticuerpos contra grelina y antagonistas de grelina (tales como los divulgados en los documentos WO01/87335 y WO02/08250), hormonas polipeptídicas y variantes de las mismas que afectan la secreción de las células de los islotes, tales como las hormonas de la secretina/polipéptido inhibidor gástrico (GIP)/polipéptido intestinal vasoactivo (VIP)/polipéptido activador de adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP)/polipéptido II similar al glucagón (GLP-II)/glicentina/familia de genes de glucagón y/o aquellas de la familia de genes del polipéptido relacionado con el gen de adrenomedulina/amilina/calcitonina (CGRP) incluyendo agonistas de GLP-1 (polipéptido 1 similar al glucagón) (por ejemplo, (1) exendina 4, (2) aquellas moléculas de GLP-I descritas en el documento US20050130891 incluyendo GLP-1 (7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37) en su forma carboxilada o amidada en el extremo C o en forma de polipéptidos de GLP-I modificados y modificaciones de los mismos, incluyendo las descritas en los párrafos 17-44 del documento US20050130891, y se emplean derivados obtenidos a partir de GLP-1-(7-34)COOH y la amida de ácido correspondiente que tienen la siguiente fórmula general: R-NH-HAEGTFTSDVSYLEGQAAKEFIWLVK-CONH₂, en donde R=H o un compuesto orgánico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Preferentemente, R es el residuo de un ácido carboxílico. Son particularmente preferidos los siguientes residuos de ácido carboxílico: formilo, acetilo, propionilo, isopropionilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo y glp-1 (polipéptido similar al glucagón 1), antagonistas de glucocorticoides, inhibidores del transportador de glucosa, secretagogos de la hormona del crecimiento (tales como los divulgados y descritos específicamente en el documento US5536716), interleucina-6 (IL-6) y moduladores de los mismos (como en el documento WO03/057237 y similares), L-carnitina, agonistas de Mc3r (receptor 3 de melanocortina), agonistas/antagonistas de MCH2R (hormona 2R concentradora de melanina), antagonistas de la hormona concentradora de melanina, agonistas de melanocortina (tales como Melanotan II o los descritos en los documentos WO 99/64002 y WO 00/74679), nomame herba, inhibidores del transportador de fosfato, compuesto fitofarm 57 (CP 644.673), piruvato, inhibidores de SCD-I (estearoil-CoA desaturasa-1), T71 (Tularik, Inc., Boulder CO), topiramato (Topimax®, indicado como anticonvulsivo que se ha demostrado que aumenta la pérdida de peso), moduladores del factor de transcripción (tales como los divulgados en el documento WO03/026576), inhibidores de la β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-1 (β -HSD-1), β -hidroxi- β -metilbutirato, p57 (Pfizer), zonisamida (Zonegran™, indicado como un antiepiléptico que se ha demostrado que conduce a la pérdida de peso), y los agentes divulgados en el documento US20030119428, párrafos 20-26.

1.2.2.7 Inhibidores de fosfodiesterasa

Los inhibidores de fosfodiesterasa ("PDE") retardan la degradación de AMP cíclico (cAMP) y/o GMP cíclico (cGMP) mediante la inhibición de las fosfodiesterasas, lo que puede conducir a un aumento relativo en la concentración intracelular de cAMP y/o cGMP. Los ejemplos no limitantes de inhibidores de PDE que se pueden usar junto con los agonistas de GCC de la invención incluyen inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4 y/o inhibidores de PDE5, en particular aquellas sustancias que pueden designarse como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4 o como tipos mixtos de inhibidores de PDE3/4/5. Se describen ejemplos no limitantes de tales inhibidores de PDE en las siguientes solicitudes de patente y patentes: DE1470341, DE2108438, DE2123328, DE2305339, DE2305575, DE2315801, DE2402908, DE2413935, DE2451417, DE2459090, DE2646469, DE2727481, DE2825048, DE2837161, DE2845220, DE2847621, DE2934747, DE3021792, DE3038166, DE3044568, EP0007118, EP0008408, EP0010759, EP0059948, EP0075436, EP0096517, EP0112987, EP0116948, 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, Pat. de EE.UU. N.º 4.963.561, 5.141.931, WO9117991, WO9200968, WO9212961, WO9307146, WO9315044, WO9315045, WO9318024, WO9319068, WO9319720, WO9319747, WO9319749, WO9319751, WO9325517, WO9402465, WO9406423, WO9412461, WO9420455, WO9422852, WO9425437, WO9427947, WO9500516, WO9501980, WO9503794, WO9504045, WO9504046, WO9505386, WO9508534, WO9509623, WO9509624, WO9509627, WO9509836, WO9514667, WO9514680, WO9514681, WO9517392, WO9517399, WO9519362, WO9522520, WO9524381, WO9527692, WO9528926, WO9535281, WO9535282, WO9600218, WO9601825, WO9602541, WO9611917, DE3142982, DE116676, DE2162096,

EP0293063, EP0463756, EP0482208, EP0579496, EP0667345, US6.331.543, US20050004222 (incluyendo los divulgados en las fórmulas I-XIII y los párrafos 37-39, 85-0545 y 557-577) y los documentos WO9307124, EP0163965, EP0393500, EP0510562, EP0553174, WO9501338 y WO9603399. Como inhibidores de PDE5 pueden mencionarse a modo de ejemplo RX-RA-69, SCH-51866, KT-734, vesnarinona, zaprinast, SKF-96231, ER-21355, BF/GP-385, NM-702 y sildenafil (Viagra®). Como inhibidores de PDE4 pueden mencionarse a modo de ejemplo RO-20-1724, MEM 1414 (R1533/R1500; Pharmacia Roche), denbufilina, rolipram, OXAGRELATO, NITRACUAZONA, Y-590, DH-6471, SKF-94120, MOTAPIZONA, LIXAZINONA, INDOLIDANO, olprinona, atizoram, KS-506-G, DIPAMFILINA, BMY-43351, atizoram, arofilina, flaminast, PDB-093, UCB-29646, CDP-840, SKF-107806, piclamilast, RS-17597, RS-25344-000, SB-207499, TIBENELAST, SB-216763, SB-211572, SB-211600, SB-212066, SB-212179, GW-3600, CDP-840, MOPIDAMOL, ANAGRELIDA, IBUDILAST, AMRINONA, PIMOBENDÁN, CILOSTAZOL, CUAZINONA y N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxibenzamida. Como inhibidores de PDE3 pueden mencionarse a modo de ejemplo SULMAZOL, AMPIZONA, cilostamida, CARBAZERANO, 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. Como inhibidores de PDE3/4 pueden mencionarse a modo de ejemplo BENAFENTRINA, TREQUINSINA, ORG-30029, zardaverina, L-686398, SDZ-ISQ-844, ORG-20241, EMD-54622 y TOLAFENTRINA. Otros inhibidores de PDE incluyen: cilomilast, pentoxifilina, roflumilast, tadalafilo (Cialis®), teofilina y vardenafilo (Levitra®), zaprinast (específico de PDE5). AGONISTA DE CCG

1.2.2.8 Agentes analgésicos

Una formulación de agonista de GCC se puede combinar simultánea o secuencialmente con uno o más agentes analgésicos. El agonista de GCC se puede unir o conectar covalentemente a un agente analgésico para crear un conjugado terapéutico. Los ejemplos no limitantes de agentes analgésicos que se pueden usar incluyen bloqueantes de los canales de calcio, antagonistas del receptor 5HT (por ejemplo, antagonistas del receptor 5HT₃, 5HT₄ y 5HT₁), agonistas del receptor opioide (loperamida, fedotozina y fentanilo), antagonistas del receptor NK₁, agonistas del receptor CCK (por ejemplo, loxiglumida), antagonistas del receptor NK₁, antagonistas de receptores de NK₃, inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina (IRNS), agonistas del receptor vainilloide y cannabanoide y sialorfina. En la técnica se conocen ejemplos adicionales de agentes analgésicos de las diversas clases.

El agente analgésico puede ser un polipéptido analgésico seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos relacionados con sialorfina, incluyendo los que comprenden la secuencia de aminoácidos QHNPR (SEQ ID NO: 239), incluyendo: VQHNPR (SEQ ID NO: 240); VRQHNPR (SEQ ID NO: 241); VRGQHNPR (SEQ ID NO: 242); VRGPQHNPR (SEQ ID NO: 243); VRGPRQHNPR (SEQ ID NO: 244); VRGPRRQHNPR (SEQ ID NO: 245); y RQHNPR (SEQ ID NO: 246). Los polipéptidos relacionados con sialorfina se unen a la neprilisina e inhiben la degradación mediada por neprilisina de la sustancia P y la Met-enkefalina. Por lo tanto, los compuestos o polipéptidos que son inhibidores de neprilisina son agentes analgésicos útiles que se pueden administrar con los agonistas de GCC descritos en el presente documento o unirse covalentemente a un agonista de GCC para formar un conjugado terapéutico. La sialorfina y los polipéptidos relacionados se describen en la Patente de EE.UU. 6.589.750; el documento U.S. 20030078200 A1; y el documento WO 02/051435 A2.

Una formulación de agonista de GCC de la divulgación puede formar parte de un régimen de terapia combinada con un antagonista o agonista del receptor opioide y se puede unir mediante un enlace covalente. Los ejemplos no limitantes de antagonistas del receptor opioide incluyen naloxona, naltrexona, metil naloxona, nalmeveno, cipridima, beta funaltrexamina, naloxonazina, naltrindol, norbinaltorfimina, pentapéptido de encefalina (HOE825; Tyr-D-Lys-Gly-Phe-L-homoserina), trimebutina, polipéptido intestinal vasoactivo, gastrina, glucagones. Los ejemplos no limitantes de agonistas del receptor opioide incluyen fedotozina, asimadolina y cetociclazocina, los compuestos descritos en los documentos WO03/097051 y WO05/007626, morfina, difeniloxilato, fraquefamida (H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH₂; el documento WO 01/019849 A1) y loperamida.

Otros ejemplos no limitantes de agentes analgésicos que se pueden usar en un régimen de terapia combinada junto con las formulaciones de agonistas de GCC de la divulgación incluyen el dipéptido Tyr-Arg (kiotorfina); el polipéptido derivado de cromogranina (CgA 47-66; véase, por ejemplo, Ghia *et al.* 2004 Regulatory polypeptides 119: 199); agonistas del receptor CCK tales como caeruleína; polipéptidos de conotoxina; análogos peptídicos de timulina (Solicitud FR 2830451); antagonistas del receptor CCK (CCKa o CCKb), incluyendo loxiglumida y dexloxiglumida (el isómero R de loxiglumida) (documento WO 88/05774); agonistas de 5-HT₄ tales como tegaserod (Zelnorm®), mosaprida, metoclopramida, zacoprida, cisaprida, renzaprida, derivados de bencimidazolona, tales como BIMU 1 y BIMU 8, y lilexaprida; bloqueantes del canal de calcio, tal como ziconotida y los compuestos relacionados descritos, por ejemplo, en los documentos EP625162B1, US 5.364.842, US 5.587.454, US 5.824.645, US 5.859.186, US 5.994.305, US 6.087.091, US 6.136.786, WO 93/13128 A1, EP 1336409 A1, EP 835126 A1, EP 835126 B1, US 5.795.864, US 5.891.849, US 6.054.429, WO 97/01351 A1; antagonistas del receptor NK-1 tales como aprepitant (Merck & Co Inc), vofopitant, ezlopitant (Pfizer, Inc.), R-673 (Hoffmann-La Roche Ltd), SR-48968 (Sanofi Synthelabo), CP-122.721 (Pfizer, Inc.), GW679769 (Glaxo Smith Kline), TAK-637 (Takeda/Abbot), SR-14033, y los compuestos relacionados descritos, por ejemplo, en los documentos EP 873753 A1, US 20010006972 A1, US 20030109417 A1, WO 01/52844 A1 (para una revisión véase Giardina *et al.* 2003.Drugs 6:758); antagonistas del receptor NK-2, tales como nepadutant (Menarini Ricerche SpA), saredutant (Sanofi-Synthelabo), GW597599 (Glaxo Smith Kline), SR-

144190 (Sanofi-Synthelabo) y UK-290795 (Pfizer Inc); antagonistas del receptor NK3, tales como osanetant (SR-142801; Sanofi-Synthelabo), SSR-241586, talnetant y los compuestos relacionados descritos, por ejemplo, en los documentos WO 02/094187 A2, EP 876347 A1, WO 97/21680 A1, US 6.277.862, WO 98/1 1090, WO 95/28418, WO 97/19927, y Boden *et al.* (J Med Chem. 39:1664-75, 1996); inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina (IRNS), tales como milnaciprán y los compuestos relacionados descritos en el documento WO 03/077897; y antagonistas del receptor vainilloide, tales como arvanilo y los compuestos relacionados descritos en el documento WO 01/64212 A1.

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

1.2.2.9 Insulina y agentes moduladores de la insulina

Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento se pueden usar en terapia combinada con insulina y compuestos relacionados que incluyen insulina de primates, roedores o conejos, incluyendo variantes biológicamente activas de las mismas que incluyen variantes alélicas, más preferentemente insulina humana disponible en forma recombinante. Las fuentes de insulina humana incluyen formulaciones farmacéuticamente aceptables y estériles tales como las disponibles en Eli Lilly (Indianápolis, Ind. 46285) como Humulin™ (origen de ADN de insulina humana). Véase, la THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 55ª Ed. (2001) Medical Economics, Thomson Healthcare (que divulga otras insulinas humanas adecuadas).

Los péptidos GCC descritos en el presente documento también se pueden usar en terapia combinada con agentes que pueden potenciar 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 el presente documento se pueden usar en terapia combinada con SYMLIN® (acetato de pramlintida) y Exenatide® (exendina 4 sintética; un polipéptido de 39 aa).

1.2.2.10 Agentes antihipertensivos

Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento se pueden usar en terapia combinada con un agente antihipertensivo que incluye, pero sin limitación: (1) diuréticos, tales como tiazidas, incluyendo clortalidona, clortiazida, diclorofenamida, hidroflumetiazida, indapamida, politiazida y hidroclorotiazida; diuréticos del asa, tales como bumetanida, ácido etacrínico, furosemida y torsemida; agentes ahorradores de potasio, tales como amilorida y triamtereno; inhibidores de la anhidrasa carbónica, osmóticos (tales como glicerina) y antagonistas de la aldosterona, tales como espironolactona, epi renona 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, teratolol, tilisolol y timolol, y similares; (3) bloqueantes de los canales de calcio tales como amlodipina, arandipina, azelnidipina, barnidipina, benidipina, bepridilo, cinaldipina, clevidipina, diltiazem, efondipina, felodipino, galopamilol, isradipino, lacidipina, lemdipina, lercanidipino, nicardipina, nifedipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, manidipina, pranidipina y verapamilol, y similares; (4) inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) tales como benazeprilo; captoprilol; ceranaprilol; cilazaprilol; delaprilol; enalaprilol; enalaprilol; fosinoprilol; imidaprilol; lisinoprilol; losinoprilol; moexiprilol; quinaprilol; quinaprilol; ramiprilol; perindoprilol; perindoprilol; quaniprilol; espiraprilol; tenocaprilol; trandolaprilol y zofenoprilol, y similares; (5) inhibidores de la endopeptidasa neutra tales como omapatrilol, cadoxatrilol y ecadotrilol, sampatrilol, AVE7688, ER4030 y similares; (6) antagonistas de endotelina tales como tezontano, A308165 y YM62899, y similares; (7) vasodilatadores tales como hidralazina, clonidina, minoxidilo y alcohol nicotínico, y similares; (8) agonistas del receptor de angiotensina II tales como aprosartán, candesartán, eprosartán, irbesartán, losartán, olmesartán, prazosartán, tasosartán, telmisartán, valsartán y EXP-3137, FI6828K y RNH6270, y similares; (9) bloqueantes α/β -adrenérgicos tales como nipradilol, arotinolol y amosulalol, y similares; (10) bloqueantes alfa 1, tales como terazosina, urapidilo, prazosina, tamsulosina, bunazosina, trimazosina, doxazosina, naftopidilo, indoramina, WHP 164 y XENOIO, y similares; (11) agonistas alfa 2 tales como lofexidina, tiamenidina, moxonidina, rilmenidina y guanobenz, y similares; (12) inhibidores de la aldosterona y similares; y (13) inhibidores de la unión a angiopoyetina-2 tales como los divulgados en el documento WO03/030833. Los agentes antihipertensivos específicos que se pueden usar junto con polipéptidos y agonistas descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación: diuréticos, tales como tiazidas (por ejemplo, clortalidona, ciclotiazida (CAS RN 2259-96-3), clortiazida (CAS RN 72956-09-3, que puede prepararse como se divulga en el documento US2809194), diclorofenamida, hidroflumetiazida, indapamida, politiazida, bendroflumetazida, metoclotazida, politiazida, tricloremetazida, clortalidona, indapamida, metolazona, quinetaazona, altiazida (CAS RN 5588-16-9, que puede prepararse como se divulga en la Patente Británica N.º 902.658), benzotiazida (CAS RN 91-33-8, que puede prepararse como se divulga en el documento US3108097), butiazida (que puede prepararse como se divulga en la Patente Británica N.º 861.367) e hidroclorotiazida), diuréticos del asa (por ejemplo, bumetanida, ácido etacrínico, furosemida y torasemida), agentes ahorradores de potasio (por ejemplo, amilorida y triamtereno (número CAS 396-01-0)) y antagonistas de aldosterona (por ejemplo, espironolactona (número CAS 52-01-7), epi renona y similares); bloqueantes β -adrenérgicos tales como amiodarona (Cordarone, Pacerone), clorhidrato de bunolol (CAS RN 31969-05-8, Parke-Davis), acebutolol ($\pm$ N-[3-acetil-4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]propoxi]fenil]-butanamida, o ($\pm$)-3'-acetil-4'-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]butiranilida), clorhidrato de acebutolol (por ejemplo, Sectral®, Wyeth-Ayerst), clorhidrato de alprenolol (CAS RN 13707-88-5, véase la Solicitud de Patente Holandesa N.º 6.605.692), atenolol (por ejemplo, Tenormin®, AstraZeneca), clorhidrato de carteolol (por

ejemplo, Cartrol® Filmtab®, Abbott), clorhidrato de celiprolol (CAS RN 57470-78-7, véase también en el documento US4034009), clorhidrato de cetamolol (CAS RN 77590-95-5, véase también en el documento US4059622), clorhidrato de labetalol (por ejemplo, Normodyne®, Schering), clorhidrato de esmolol (por ejemplo, Brevibloc®, Baxter), clorhidrato de levobetaxolol (por ejemplo, suspensión oftálmica Betaxon™, Alcon), clorhidrato de levobunolol (por ejemplo, Betagan® Liquifilm® con C CAP® Compliance Cap, Allergan), nadolol (por ejemplo, Nadolol, Mylan), practolol (CAS RN 6673-35-4, véase además el documento US3408387), clorhidrato de propranolol (CAS RN 318-98-9), clorhidrato de sotalol (por ejemplo, Betapace AF™, Berlex), timolol (2-Propanol, 1-[(1,1-dimetiletil)amino]-3-[[4-(4-morfolinil)-1,2,5-tiadiazol-3-il]oxi]-, hemihidrato, (S)-, CAS RN 91524-16-2), maleato de timolol-sal (Z)-2-butenodioato de (S)-1-[(1,1-dimetiletil) amino]-3-[[4-(4-morfolinil)-1,2,5-tiadiazol-3-il]oxi]-2-propanol (1:1), CAS RN 26921-17-5), bisoprolol (2-Propanol, 1-[4-[[2-(1-metiletoxi)etoxi]-metil]fenoxil]-3-[(1-metiletil)amino]-, (±), CAS RN 66722-44-9), fumarato de bisoprolol (tal como (E)-2-butenodioato de (±)-1-[4-[[2-(1-metiletoxi)etoxi]metil]fenoxil]-3-[(1-metiletil)amino]-2-propanol (2:1) (sal), por ejemplo, Zebeta™, Lederle Consumer), nebivalol (2H-1-benzopiran-2-metanol, αα'-[iminobis(metilen)]bis[6-fluoro-3,4-dihidro-, CAS RN 99200-09-6, véase además la Pat. de EE.UU. N.º 4.654.362), clorhidrato de cicloprolol, tal como 2-propanol, 1-[4-[2-(ciclopropilmetoxi)etoxi]fenoxil]-3-[(1-metiletil)amino]-, clorhidrato, A.A.S. RN 63686-79-3), clorhidrato de dexpropranolol (2-Propanol, 1-[1-metiletil)-amino]-3-(1-naftaaleniloxi)-clorhidrato (CAS RN 13071-11-9), clorhidrato de diacetolol (acetamida, N-[3-acetil-4-[2-hidroxi-3-[(1-metil-etil)amino]propoxil]fenil]-, monoclorhidrato CAS RN 69796-04-9), clorhidrato de dilevalol (benzamida, 2-hidroxi-5-[1-hidroxi-2-[1-metil-3-fenilpropil]amino]etil]-, monoclorhidrato, CAS RN 75659-08-4), clorhidrato de exaprolol (2-propanol, 1-(2-ciclohexilfenoxi)-3-[(1-metiletil)amino]-, clorhidrato CAS RN 59333-90-3), sulfato de flestolol (ácido benzoico, 2-fluoro-, 3-[[2-aminocarbonil]amino]-dimetiletil)amino]-2-hidroxipropil éster, (+)- sulfato (1:1) (sal), CAS RN 88844-73-9; clorhidrato de metalol (metanosulfonamida, N-[4-[1-hidroxi-2-(metilamino)propil]fenil]-, monoclorhidrato CAS RN 7701-65-7), metoprolol 2-propanol, 1-[4-(2-metoxietil)fenoxil]-3-[(1-metiletil)amino]-; CAS RN 37350-58-6), tartrato de metoprolol (tal como 2-propanol, 1-[4-(2-metoxietil)fenoxil]-3-[(1-metiletil)amino]-, por ejemplo, Lopressor®, Novartis), sulfato de pamatolol (ácido carbámico, [2-[4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]propoxil]fenil]-etil]-, éster metílico, (±) sulfato (sal) (2:1), CAS RN 59954-01-7), sulfato de penbutolol (2-propanol, 1-(2-ciclopentilfenoxi)-3-[1,1-dimetiletil)amino] 1, (S)-, sulfato (2:1) (sal), CAS RN 38363-32-5), practolol (acetamida, N-[4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]-propoxil]fenil]-, CAS RN 6673-35-4); clorhidrato de tiprenolol (propanol, 1-[(1-metiletil)amino]-3-[2-(metiltio)-fenoxil]-, clorhidrato, (±), CAS RN 39832-43-4), tolamolol (benzamida, 4-[2-[[2-hidroxi-3-(2-metilfenoxi)-propil]amino]etoxil]-, CAS RN 38103-61-6), bopindolol, indenolol, pindolol, propanolol, tertatolol y tilisolol, y similares; bloqueantes del canal de calcio, tales como sal besilato de amlodipino (tal como dicarboxilato benzenosulfonato de 3-etil-5-metil-2-(2-aminoetoximetil)-4-(2-clorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridina, por ejemplo, Norvasc®, Pfizer), maleato de clentiazem (1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona, 3-(acetiloxi)-8-cloro-5-[2-(dimetilamino)etil]-2,3-dihidro-2-(4-metoxifenil)-(2S-cis)-, (Z)-2-butenodioato (1:1), véase además el documento US4567195), isradipina (ácido 3,5-piridindicarboxílico, 4-(4-benzofurazanil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-, metil 1-metiletil éster, dicarboxilato de (±)-4-(4-benzofurazanil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridina, véase también el documento US4466972); nimodipino (tal como isopropilo (2-metoxietil) 1, 4-dihidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5-piridina-dicarboxilato, por ejemplo, Nimotop®, Bayer), felodipino (tal como etil metil 4-(2,3-diclorofenil)-1,4-dihidro-2,6-dimetil-3,5-piridindicarboxilato-, por ejemplo, Plendil® de liberación prolongada, AstraZeneca LP), nilvadipino (ácido 3,5-piridindicarboxílico, 2-ciano-1,4-dihidro-6-metil-4-(3-nitrofenil)-, 3-metil-5-(1-metiletil) éster, además, véase el documento US3799934), nifedipino (tal como ácido 3,5-piridindicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, éster dimetílico, por ejemplo, comprimidos de liberación prolongada Procardia XL®, Pfizer), clorhidrato de diltiazem (tal como 1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona, 3-(acetiloxi)-5[2-(dimetilamino)etil]-2,3-dihidro-2-(4-metoxifenil)-, monoclorhidrato, (+)-cis, por ejemplo, Tiazac®, Forest), clorhidrato de verapamilo (tal como benzenoacetronitrilo, clorhidrato de (alfa)-[[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi-(alfa)-(1-metiletilo), por ejemplo, Isoptin® SR, Knoll Labs), clorhidrato de teludipino (ácido 3,5-piridindicarboxílico, 2-[(dimetilamino)metil]4-[2-[(1E)-3-(1,1-dimetiletoxi)-3-oxo-1-propenil]fenil]-1,4-dihidro-6-metil-, dietil éster, monoclorhidrato) CAS RN 108700-03-4), belfosdilo (ácido fosfónico, [2-(2-fenoxietil)-1,3-propano-diil]bis-, tetrabutil éster CAS RN 103486-79-9), fostedilo (ácido fosfónico, [[4-(2-benzotiazolil)fenil]metil]-, dietil éster CAS RN 75889-62-2), aranidipina, azelnidipina, barnidipina, benidipina, bepridilo, cinaldipina, clevidipina, efonidipina, galopamilo, lacidipina, lemidipina, lercanidipino, maleato de monatepilo (1-piperazinabutanamida, N-(6,11-dihidro-dibenzo(b,e)tiepin-11-il)4-(4-fluorofenil)-, (+)-, (Z)-2-butenodioato (1:1) maleato de (±)-N-(6,11-dihidro-dibenzo(b,e)tiepin-11-il)-4-(p-fluorofenil)-1-piperazinabutanamida (1:1) CAS RN 132046-06-1), nicardipina, nisoldipina, nitrendipina, manidipina, pranidipina y similares; antagonistas del calcio del canal T tal como mibefradilo; inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (ACE) tales como benazeprilo, clorhidrato de benazeprilo (tal como monoclorhidrato del ácido 3-[[1-(etoxicarbonil)-3-fenil-(1S)-propil]amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1H-1-(3 S)-benzazepin-1-acético, por ejemplo, Lotrel®, Novartis), captoprilo (tal como 1-[(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina, por ejemplo, captoprilo, Mylan, CAS RN 62571-86-2 y otros divulgados en el documento US4046889), ceranaprilo (y otros divulgados en el documento US4452790), cetaprilo (alaceprilo, Dainippon divulgado en Eur. Therap. Res. 39:671 (1986); 40:543 (1986)), cilazapril (Hoffman-LaRoche) divulgado en J. Cardiovasc. Pharmacol. 9:39 (1987), indalaprilo (clorhidrato de delaprilo (2H-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamida, 3-biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il-6-cloro-3,4-dihidro-, 1,1-dióxido CAS RN 2259-96-3); divulgado en el documento US4385051), enalapril (y otros divulgados en el documento US4374829), enalapril, enalaprilat, fosinopril, ((tal como L-prolina, 4-ciclohexil-1-[[[2-metil-1-(1-oxopropoxi)propoxi](4-fenilbutil)fosfinil]acetil]-, sal de sodio, por ejemplo, monoprilo, Bristol-Myers Squibb y otros divulgados en el documento US4168267), fosinopril sódico (L-prolina, 4-ciclohexil-1-[(R)-[(1S)-2-metil-1-(1-oxopropoxi)propoxi], imidaprilo, indolaprilo (Schering, divulgado en J. Cardiovasc. Pharmacol. 5:643, 655 (1983)), lisinopril (Merck), losinopril, moexiprilo, clorhidrato de moexiprilo (ácido 3-isoquinolinocarboxílico, 2-[(2S)-2-[[[(1S)-1-(etoxicarbonil)-3-fenilpropil]amino]-1-oxopropil]-1-, 2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-, monoclorhidrato, (3S)- CAS RN

82586-52-5), quinapril, quinaprilat, ramipril (Hoechst) divulgado en el documento EP 79022 y Curr. Ther. Res. 40:74 (1986), perindopril erbumina (tal como ácido 2S,3aS,7aS-1-[(S)-N-[(S)-1-carboxibutil]alanil]hexahidro-indolincarboxílico, 1-etil éster, compuesto con *tert*-butilamina (1:1), por ejemplo, Aceon®, Solvay), perindopril (Servier, divulgado en Eur. J. clin. Pharmacol. 31: 519 (1987)), quanipril (divulgado en el documento US4344949), espirapril (Schering, divulgado en Acta. Pharmacol. Toxicol. 59 (Sup. 5): 173 (1986)), tenocapril, trandolapril, zofenopril (y otros divulgados en el documento US4316906), rentiapril (fentiapril, divulgado en Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 10:131 (1983)), pivopril, YS980, teprotida (potenciador de bradicinina BPP9a CAS RN 35115-60-7), BRL 36,378 (Smith Kline Beecham, véanse los documentos EP80822 y EP60668), MC-838 (Chugai, véanse CA. 102:72588v y Jap. J. Pharmacol. 40:373 (1986), CGS 14824 (Ciba-Geigy, HCl del ácido 3-[(1-etoxicarbonil-3-fenil-(1S)-propil)amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1-(3S)-benzazepin-1-acético, véase la Patente de Reino Unido N.º 2103614), CGS 16.617 (Ciba-Geigy, ácido 3(S)-[[[(1S)-5-amino-1-carboxipentil]amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-1H-1-benzazepin-1-etanoico, véase el documento US4473575), Ru 44570 (Hoechst, véase Arzneimittelforschung 34:1254 (1985)), R 31-2201 (Hoffman-LaRoche, véase FEBS Lett. 165:201 (1984)), CI925 (Pharmacologist 26:243, 266 (1984)), WY-44221 (Wyeth, véase J. Med. Chem. 26:394 (1983)), y los divulgados en los documentos US2003006922 (párrafo 28), US4337201, US4432971 (fosfonamidas); inhibidores de la endopeptidasa neutra tales como omapatrilat (Vaniev®), CGS 30440, cadoxatril y ecadotril, fasidotril (también conocido como aladotril o alatriopril), sampatrilat, mixanprilo y gemopatrilat, AVE7688, ER4030, y los divulgados en los documentos US5362727, US5366973, US5225401, US4722810, US5223516, US4749688, US5552397, US5504080, US5612359, US5525723, EP0599444, EP0481522, EP0599444, EP0595610, EP0534363, EP534396, EP534492, EP0629627; antagonistas de endotelina tales como tezoseptano, A308165 y YM62899, y similares; vasodiladores tales como hidralazina (apresolina), clonidina (clorhidrato de clonidina (1H-imidazol-2-amino, N-(2,6-diclorofenil)4,5-dihidro-, monoclórhidrato CAS RN 4205-91-8), catapres, minoxidilo (loniten), alcohol nicotínico (roniacol), clorhidrato de diltiazem (tal como 1,5-benzotiazepin-4(5H)-ona,3-(acetiloxi)-5[2-(dimetilamino)etil]-2,3-dihidro-2(4-metoxifenil)-, monoclórhidrato, (+)-cis, por ejemplo, Tiazac®, Forest), dinitrato de isosorbida (tal como 1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol 2,5-dinitrato, por ejemplo, Isordil® Titrados®, Wyeth-Ayerst), mononitrato de isosorbida (tal como 1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol-1,5-nitrato, un nitrato orgánico, por ejemplo, Ismo®, Wyeth-Ayerst), nitroglicerina (tal como trinitrato de 2,3 propanetriol, por ejemplo, Nitrostat® Parke-Davis), clorhidrato de verapamilo (tal como bencenoacetónitrilo, clorhidrato de (±)-(alfa)[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi-(alfa)-(1-metiletilo), por ejemplo, Covera HS® de liberación prolongada, Searle), cromonar (que puede prepararse como se divulga en el documento US3282938), clonitato (Annalen 1870 155), droprenilamina (que puede prepararse como se divulga en el documento DE2521113), lidoflazina (que puede prepararse como se divulga en el documento US3267104); prenilarina (que puede prepararse como se divulga en el documento US3152173), nitrato de propatilo (que puede prepararse como se divulga en la Patente Francesa N.º 1.103.113), clorhidrato de miflozina (1-piperazinacetamida, 3-(aminocarbonil)4-[4,4-bis(4-fluorofenil)butil]-N-(2,6-diclorofenil)-, diclorhidrato CAS RN 83898-67-3), mixidina (bencenoetanamina, 3,4-dimetoxi-N-(1-metil-2-pirrolidinilideno)-pirrolidina, 2-[(3,4-dimetoxifenil)imino]-1-metil-1-metil-2-[(3,4-dimetoxifenil)imino]pirrolidina CAS RN 27737-38-8), molsidomina (1,2,3-oxadiazolol, 5-[(etoxicarbonil)amino]-3-(4-morfolinil)-, sal interna CAS RN 25717-80-0), mononitrato de isosorbida (D-Glucitol, 1,4:3,6-dianhidro-, 5-nitrato CAS RN 16051-77-7), tetranitrato de eritritol (1,2,3,4-butanotetrol, tetranitrato, (2R,3S)-rel- CAS RN 7297-25-8), clonitrato (1,2-propanodiol, 3-cloro, dinitrato (7Cl, 8Cl, 9Cl) CAS RN 2612-33-1), dipiridamol etanol, 2,2',2'',2'''-[(4,8-di-1-piperidinilpirimido[5,4-d]pirimidin-2,6-diil)dinitrilo]tetraquis- CAS RN 58-32-2), nicorandilo (CAS RN 65141-46-03-), piridincarboxamida (ácido N-[2-(nitrooxi)etil]-N-isoldipina-3,5-piridindicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, metil 2-metilpropil éster CAS RN 63675-72-9), ácido nifedipin-3,5-piridindicarboxílico, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-, dimetil éster CAS RN 21829-25-4), maleato de perhexilina (piperidina, 2-(2,2-diciclohexiletil)-, (2Z)-2-butenodioato (1:1) CAS RN 6724-53-4), clorhidrato de oxprenolol (2-propanol, 1-[(1-metiletil)amino]-3-[2-(2-propenilo)fenoxi]-, clorhidrato CAS RN 6452-73-9), pentritinol (1,3-propanodiol, 2,2-bis[(nitrooxi)metil]-, mononitrato (éster) CAS RN 1607-17-6), verapamilo (bencenoacetónitrilo, α-[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-metilamino]propil]-3,4-dimetoxi-α-(1-metiletil)- CAS RN 52-53-9) y similares; antagonistas del receptor de angiotensina II tales como, aprosartán, zolasartán, olmesartán, prazosartán, Fl6828K, RNH6270, candesartán (ácido 1H-bencimidazol-7-carboxílico, 2-etoxi-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]1,1'-bifenil]4-il]metil]- CAS RN 139481-59-7), candesartán cilexetil (carboxilato de (+/-)-1-(ciclohexilcarbonilo)etil-2-etoxi-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]bifenil-4-il]-1H-bencimidazol, CAS RN 145040-37-5, documentos US5703110 y US5196444), eprosartán (ácido 3-[1-4-carboxifenilmetil]-2-n-butyl-imidazol-5-il]-[2-tienilmetil]propenoico, documentos US5185351 y US5650650), irbesartán (2-n-butyl-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]bifenil-4-il]metil]1,3-diazaespiro[4,4]non-1-en-4-ona, documentos US5270317 y US5352788), losartán (2-N-butyl-4-cloro-5-hidroximetil-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]bifenil-4-il]-metil]imidazol, sal de potasio, US5138069, US5153197 y US5128355), tasosartán (5,8-dihidro-2,4-dimetil-8-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]1,1'-bifenil]4-il]metil]-pirido[2,3-d]pirimidin-7(6H)-ona, documento US5149699), telmisartán (ácido 4'-[[1,4-dimetil-2'-propil-(2,6'-bi-1H-bencimidazol)-r-il]]-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico, CAS RN 144701-48-4, documento US591762), milfasartán, abitesartán, valsartán (Diovan® (Novartis), (S)-N-valeril-N-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]bifenil-4-il]metil]valina, documento US5399578), EXP-3137 (ácido 2-N-butyl-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]bifenil-4-il]-metil]imidazol-5-carboxílico, US5138069, US5153197 y US5128355), 3-(2'-(tetrazol-5-il)-1,1'-bifen-4-il)metil-5,7-dimetil-2-etil-3H-imidazo[4,5-b]piridina, ácido 4'-[2-etil-4-metil-6-(5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridin-2-il]-bencimidazol-1-il]-metil]-1,1'-bifenil]-2-carboxílico, 2-butyl-6-(1-metoxi-1-metiletil)-2-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]bifenil-4-il]metil]quinazolin-4(3H)-ona, 3-[2'-carboxibifenil-4-il]metil]-2-ciclopropil-7-metil-3H-imidazo[4,5-b]piridina, ácido 2-butyl-4-cloro-1-[[2'-(tetrazol-5-il)]bifenil-4-il]metil]imidazol-carboxílico, sal potásica de 1-(etoxicarbonil-oxi)etil éster del ácido 2-butyl-4-cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-carboxílico, 2-butyl-4-(metilitio)-1-[[2-[[[(propilamino)carbonil]amino]-sulfonil](1,1'-bifenil)-4-il]metil]-1H-imidazol-5-carboxilato de dipotasio, 2-[[4-butyl-2-metil-6-oxo-5-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)]1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1-(6H)-pirimidinil]metil]-

3-tiofencarboxilato de metilo, 5-[(3,5-dibutil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]-2-[2-(1H-tetrazol-5-ilfenil)]piridina, 6-butil-2-(2-fenilet)-5 [[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-metil]pirimidin-4-(3H)-ona, sal de D,L lisina, 5-metil-7-n-propil-8-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-[1,2,4]-triazolo[1,5-c]pirimidin-2(3H)-ona, sal potásica de 2,7-dietil-5-[[2'-(5-tetrazol)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-bifenilmetil]-3H-imidazol[4,5-c]piridin-5-ilmetil]benzoico, éster etílico, sal de potasio, 3-metoxi-2,6-dimetil-4-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)-1,1'-bifenil-4-il]metoxi]piridina, ácido 2-etoxi-1-[[2'-(5-oxo-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-3-il)bifenil-4-il]metil]-1H-bencimidazol-7-carboxílico, ácido 1-[N-(2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il-metil)-N-valerolilaminometil]ciclopentano-1-carboxílico, 7-metil-2n-propil-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-3H-imidazo[4,5-6]piridina, benzoato de 2-[5-[(2-etil-5,7-dimetil-3H-imidazo[4,5-b]piridin-3-il)metil]-2-quinolinil]sodio, 2-butil-6-cloro-4-hidroximetil-5-metil-3-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]piridina, ácido 2-[[[2-butil-1-[(4-carboxifenil)metil]-1H-imidazol-5-il]metil]amino]benzoico, tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]pirimidin-6-ona, 4(S)-[4-(carboximetil)fenoxi]-N-[2(R)-[4-(2-sulfobenzamido)imidazol-1-il]octanoil]-L-prolina, 1-(2,6-dimetilfenil)-4-butil-1,3-dihidro-3-[[6-[2-(1H-tetrazol-5-il)fenil]-3-piridinil]metil]-2H-imidazol-2-ona, 5,8-etano-5,8-dimetil-2-n-propil-5,6,7,8-tetrahidro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil]-1H,4H-1,3,4a,8a-tetrazaciclopentanaftaleno-9-ona, 4-[1-[2'-(1,2,3,4-tetrazol-5-il)bifen-4-il]metilamino]-5,6,7,8-tetrahidro-2-trifilquinazolina, 2-(2-clorobenzol)imino-5-etil-3-[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil-1,3,4-tiadiazol-3,4-dipotásica del ácido 2-[5-etil-3-[2-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil-1,3,4-tiazolin-2-ilideno]aminocarbonil-1-ciclopentencarboxílico, y 1-etoxicarboniloxietil éster del 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 divulgados en las publicaciones de patente EP475206, EP497150, EP539086, EP539713, EP535463, EP535465, EP542059, EP497121, EP535420, EP407342, EP415886, EP424317, EP435827, EP433983, EP475898, EP490820, EP528762, EP324377, EP323841, EP420237, EP500297, EP426021, EP480204, EP429257, EP430709, EP434249, EP446062, EP505954, EP524217, EP514197, EP514198, EP514193, EP514192, EP450566, EP468372, EP485929, EP503162, EP533058, EP467207 EP399731, EP399732, EP412848, EP453210, EP456442, EP470794, EP470795, EP495626, EP495627, EP499414, EP499416, EP499415, EP511791, EP516392, EP520723, EP520724, EP539066, EP438869, EP505893, EP530702, EP400835, EP400974, EP401030, EP407102, EP411766, EP409332, EP412594, EP419048, EP480659, EP481614, EP490587, EP467715, EP479479, EP502725, EP503838, EP505098, EP505111, EP513.979, EP507594, EP510812, EP511767, EP512675, EP512676, EP512870, EP517357, EP537937, EP534706, EP527534, EP540356, EP461040, EP540039, EP465368, EP498723, EP498722, EP498721, EP515265, EP503785, EP501892, EP519831, EP532410, EP498361, EP432737, EP504888, EP508393, EP508445, EP403159, EP403158, EP425211, EP427463, EP437103, EP481448, EP488532, EP501269, EP500409, EP540400, EP005528, EP028834, EP028833, EP411507, EP425921, EP430300, EP434038, EP442473, EP443568, EP445811, EP459136, EP483683, EP518033, EP520423, EP531876, EP531874, EP392317, EP468470, EP470543, EP502314, EP529253, EP543263, EP540209, EP449699, EP465323, EP521768, EP415594, WO92/14468, WO93/08171, WO93/08169, WO91/00277, WO91/00281, WO91/14367, WO92/00067, WO92/00977, WO92/20342, WO93/04045, WO93/04046, WO91/15206, WO92/14714, WO92/09600, WO92/16552, WO93/05025, WO93/03018, WO91/07404, WO92/02508, WO92/13853, WO91/19697, WO91/11909, WO91/12001, WO91/11999, WO91/15209, WO91/15479, WO92/20687, WO92/20662, WO92/20661, WO93/01177, WO91/14679, WO91/13063, WO92/13564, WO91/17148, WO91/18888, WO91/19715, WO92/02257, WO92/04335, WO92/05161, WO92/07852, WO92/15577, WO93/03033, WO91/16313, WO92/00068, WO92/02510, WO92/09278, WO9210179, WO92/10180, WO92/10186, WO92/10181, WO92/10097, WO92/10183, WO92/10182, WO92/10187, WO92/10184, WO92/10188, WO92/10180, WO92/10185, WO92/20651, WO93/03722, WO93/06828, WO93/03040, WO92/19211, WO92/22533, WO92/06081, WO92/05784, WO93/00341, WO92/04343, WO92/04059, US5104877, US5187168, US5149699, US5185340, US4880804, US5138069, US4916129, US5153197, US5173494, US5137906, US5155126, US5140037, US5137902, US5157026, US5053329, US5132216, US5057522, US5066586, US5089626, US5049565, US5087702, US5124335, US5102880, US5128327, US5151435, US5202322, US5187159, US5198438, US5182288, US5036048, US5140036, US5087634, US5196537, US5153347, US5191086, US5190942, US5177097, US5212177, US5208234, US5208235, US5212195, US5130439, US5045540, US5041152 y US5210204, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; bloqueantes α/β adrenérgicos, tales como nipradilol, arotinolol, amosulalol, tosilato de bretilio (CAS RN: 61-75-6), mesilato de dihidroergtamina (tal como ergotaman-3',6',18-triona,9,-10-dihidro-12'-hidroxi-2'-metil-5'-(fenilmetil)-, (5'(α))-, monometanosulfonato, por ejemplo, inyección DHE 45[®], Novartis), carvedilol (tal como ($\pm$)-1-(carbazol-4-iloxi)-3-[[2-(o-metoxifenoxi)etil]amino]-2-propanol, por ejemplo, Coreg[®], SmithKline Beecham), labetalol (tal como monoclórhidrato de 5-[1-hidroxi-2-[(1-metil-3-fenilpropil)amino]etil]salicilamida, por ejemplo, Normodyne[®], Schering), tosilato de bretilio (bencenometanaminio, 2-bromo-N-etil-N,N-dimetil-, sal con ácido 4-metilbencenosulfónico (1:1) CAS RN 61-75-6), mesilato de fentolamina (fenol, 3-[[[(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil](4-metilfenil)amino]-, monometanosulfonato (sal) CAS RN 65-28-1), tartrato de solipertina (5H-1,3-Dioxolo[4,5-f]indol, 7-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-, (2R,3R)-2,3-dihidroxi-butanodioato (1:1) CAS RN 5591-43-5), clorhidrato de zolertina (piperazina, 1-fenil-4-[2-(1H-tetrazol-5-il)etil]-, monoclórhidrato (8Cl, 9Cl) CAS RN 7241-94-3) y similares; bloqueantes del receptor α adrenérgico, tales como alfuzosina (CAS RN: 81403-68-1), terazosina, urapidol, prazosina (Minipress[®]), tamsulosina, bunazosina, trimazosina, doxazosina, naftopidilo, indoramina, WHP 164, XENOIO, clorhidrato de fenspirida (que puede prepararse como se divulga en el documento US3399192), proroxano (CAS RN 33743-96-3), y clorhidrato de labetalol y combinaciones de los mismos; agonistas α 2 tales como metildopa, HCl de metildopa, lofexidina, tiamenidina, moxonidina, rilmenidina, guanobenz y similares; inhibidores de la aldosterona y similares; inhibidores de renina, incluyendo aliskiren (SPP100; Novartis/Speedel); inhibidores de la unión a angiotensina-2 tales como los divulgados en el documento WO03/030833; agentes antianginosos, tales como ranolazina (clorhidrato de 1-piperazinaacetamida, N-(2,6-dimetilfenil)-4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil]-, diclorhidrato CAS RN 95635-56-6), clorhidrato de betaxolol (2-propanol, 1-[4-[2(ciclopropilmetoxi)etil]fenoxi]-3-[(1-metiletil)amino]-, clorhidrato CAS RN 63659-19-8), clorhidrato de butoprozina (metanona, [4-

[3(dibutilamino)propoxi]fenil](2-etil-3-indolizil)-, monoclóhidrato CAS RN 62134-34-3), cinepazet maleate-ácido piperazinacético, 4-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-, éster etílico, (2Z)-2-butenodioato (1:1) CAS RN 50679-07-7), tosifeno (bencenosulfonamida, 4-metil-N-[[[(1S)-1-metil-2-feniletil]amino]carbonil]- CAS RN 32295-184), clorhidrato de verapamilo (bencenoacetonitrilo, α -[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi- α -(1-metiletil)-, monoclóhidrato CAS RN 152-114), molsidomina (1,2,3-oxadiazolio, 5-[(etoxicarbonil)amino]-3-(4-morfolinil)-, sal interna CAS RN 25717-80-0), y clorhidrato de ranolazina (1-piperazinacetamida, N-(2,6-dimetilfenil)4-[2-hidroxi-3-(2-metoxifenoxi)propil]-, diclorhidrato CAS RN 95635-56-6); tosifeno (bencenosulfonamida, 4-metil-N-[[[(1S)-1-metil-2-feniletil]amino]carbonil]- CAS RN 32295-184); estimulantes adrenérgicos tales como clorhidrato de guanfacina (tal como clorhidrato de N-amidino-2-(2,6-diclorofenil)acetamida, por ejemplo, comprimidos Tenex® disponibles en Robins); metildopa-hidroclorotiazida (tal como levo-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilalanina) combinada con hidroclorotiazida (tal como 1,1-dióxido de 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamida, por ejemplo, la combinación en forma de, por ejemplo, comprimidos Aldoril® disponibles en Merck), metildopa-clorotiazida (tal como 1,1-dióxido de 6-cloro-2H-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamida y metildopa como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, Aldoclor®, Merck), clorhidrato de clonidina (tal como clorhidrato de 2-(2,6-diclorofenilamino)-2-imidazolina y clortalidona (tal como 2-cloro-5-(1-hidroxi-3-oxo-1-isoindolinil)bencenosulfonamida), por ejemplo, Combipres®, Boehringer Ingelheim), clorhidrato de clonidina (tal como clorhidrato de 2-(2,6-diclorofenilamino)-2-imidazolina, por ejemplo, Catapres®, Boehringer Ingelheim), clonidina (1H-imidazol-2-amina, N-(2,6-diclorofenil)4,5-dihidro-CAS RN 4205-90-7), Hyzaar (Merck; una combinación de losartán e hidroclorotiazida), Co-Diovan (Novartis; una combinación de valsartán e hidroclorotiazida), Lotrel (Novartis; una combinación de benazeprilo y amlodipino) y Caduet (Pfizer; una combinación de amlodipino y atorvastatina), y los agentes descritos en el documento US20030069221.

1.2.2.11 Agentes para el tratamiento de trastornos respiratorios

Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento se pueden usar en terapia combinada con uno o más de los siguientes agentes útiles en el tratamiento de trastornos respiratorios y otros trastornos que incluyen, pero sin limitación: (1) agonistas β , incluyendo, pero sin limitación: albuterol (PRO VENTIL®, SALBUTAMOL®, VENTOLIN®), bambuterol, bitoterol, clenbuterol, fenoterol, formoterol, isoetarina (BRONKOSOL®, BRONKOMETER®), metaproterenol (ALUPENT®, METAPREL®), pirbuterol (MAXAIR®), reproterol, rimiterol, salmeterol, terbutalina (BRETHAIRE®, BRETHINE®, BRICANYL®), adrenalina, isoproterenol (ISUPREL®), bitartrato de epinefrina (PRIMATENE®), efedrina, orciprenlina, fenoterol e isoetarina; (2) corticoides, incluyendo, pero sin limitación, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, budesonida, bunedósido, butixocort, dexametasona, flunisolida, fluocortina, fluticasona, hidroclortisona, metil prednisona, mometasona, predonisolona, prednisona, tipredane, tixocortal, triamcinolona y triamcinolona acetona; (3) combinaciones de agonistas β_2 y corticosteroides [por ejemplo, salmeterol-fluticasona (AD V AIR®), formoterol-budesonida (SYMBICORT®)]; (4) antagonistas del receptor de leucotrienos D4/antagonistas de leucotrienos/antagonistas de LTD4 (es decir, cualquier compuesto que sea capaz de bloquear, inhibir, reducir o interrumpir de otro modo la interacción entre los leucotrienos y el receptor Cys LTI), incluyendo, pero sin limitación: zafirlukast, montelukast, montelukast sódico (SINGULAIR®), pranlukast, iralukast, pobilukast, SKB-106.203 y compuestos descritos por tener actividad antagonista de LTD4 descrita en la Patente de EE.UU. N.º 5.565.473; (5) inhibidores de 5-lipoxigenasa y/o inhibidores de la biosíntesis de leucotrienos [por ejemplo, zileuton y BAY1005 (registro CA 128253-31-6)]; (6) antagonistas/antihistamínicos del receptor de histamina H1 (es decir, cualquier compuesto que sea capaz de bloquear, inhibir, reducir o interrumpir de otro modo la interacción entre la histamina y su receptor), incluyendo, pero sin limitación: astemizol, acrivastina, antazolina, azatadina, azelastina, astemizol, bromofeniramina, maleato de bromofeniramina, carbinoxamina, carebastina, cetirizina, clorfeniramina, maleato de clorfeniramina, cimetidina, clemastina, ciclicina, ciproheptadina, descarboetoxiloratadina, dexclorfeniramina, dimetindeno, difenhidramina, difenilpiralina, succinato de doxilamina, doxilarnina, ebastina, efetirizina, epinastina, famotidina, fexofenadina, hidroxizina, hidroxizina, ketotifeno, levocabastina, levocetirizina, loratadina, meclizina, mepiramina, mequitazina, metildiazina, mianserina, mizolastina, noberastina, norastemizol, noraztemizol, fenindamina, feniramina, picumast, prometazina, pinlamina, pirilamina, ranitidina, temelastina, terfenadina, trimeprazina, tripelenamina y triprolidina; (7) un anticolinérgico, incluyendo, pero sin limitación: atropina, benzatropina, biperideno, flutropio, hiosciamina (por ejemplo, Levsin®, Levbid®, Levsin/SL®, Anaspaz®, Levsinex timecaps®, NuLev®), ilutropio, ipratropio, bromuro de ipratropio, metescopolamina, oxibutinin, rispenzepina, escopolamina y tiotropio; (8) un antitusivo, incluyendo pero sin limitación: dextrometorfano, codeína e hidromorfona; (9) un descongestionante, incluyendo pero sin limitación: pseudoefedrina y fenilpropanolamina; (10) un expectorante, incluyendo pero sin limitación: guaifenesina, guaicol sulfato, terpina, cloruro de amonio, guaicolato de glicerol y glicerol yodado; (11) un broncodilatador, incluyendo pero sin limitación: teofilina y aminofilina; (12) un antiinflamatorio, incluyendo pero sin limitación: flurbiprofeno, diclofenaco, indometacina, ketoprofeno, S-ketoprofeno, tenoxicam; (13) un inhibidor de PDE (fosfodiesterasa), incluyendo pero sin limitación, los divulgados en el presente documento; (14) un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante [por ejemplo, xolair (también denominado omalizumab), rhuMab y talizumab]; (15) un tensioactivo pulmonar humanizado que incluye formas recombinantes de proteínas tensioactivas SP-B, SP-C o SP-D [por ejemplo, SURFAXIN®, anteriormente conocido como dsc-104 (Discovery Laboratories)], (16) agentes que inhiben los canales de sodio epiteliales (ENaC), tales como amilorida y compuestos relacionados; (17) agentes antimicrobianos usados para tratar infecciones pulmonares tales como aciclovir, amikacina, amoxicilina, doxiciclina, trimetoprina sulfametoxazol, anfotericina B, azitromicina, claritromicina, roxitromicina, claritromicina, cefalosporinas (cefotaxima, cefmetazol, etc.), ciprofloxacino, etambutol, gentamicina, ganciclovir, imipenem, isoniazida, itraconazol, penicilina, ribavirina, rifampina, rifabutina, amantadina, rimantidina, estreptomina, tobramicina y vancomicina; (18) agentes que activan la secreción de cloruro

a través de canales de cloruro dependientes de Ca^{++} (tales como agonistas del receptor purinérgico (P2Y(2)); (19) agentes que disminuyen la viscosidad del esputo, tales como DNasa 1 recombinante humana, (Pulmozyme®); (20) agentes antiinflamatorios no esteroides (acemetacina, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, alclofenaco, alminoprofeno, apazona, aspirina, benoxaprofeno, benzopiperilona, ácido buclórico, carprofeno, clidanaco, diclofenaco, diclofenaco, diflunisal, diflusinal, etodolaco, fenbufeno, fenbufeno, fenclofenaco, ácido fenclozónico, fenoprofeno, fentiazaco, feprazona, ácido flufenámico, flufenisal, flufenisal, fluprofeno, flurbiprofeno, flurbiprofeno, furofenaco, ibufenaco, ibuprofeno, indometacina, indometacina, indoprofeno, isoxepac, isoxicam, ketoprofeno, ketoprofeno, cetorolaco, ácido meclofenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido mefenámico, mioprofeno, mofebutazona, nabumetona oxaprozina, naproxeno, naproxeno, ácido niflúmico, oxaprozina, oxpinaco, oxifenbutazona, fenacetina, fenilbutazona, fenilbutazona, piroxicam, piroxicam, piroprofeno, pranoprofeno, sudoxicam, tenoxicano, sulfasalazina, sulindaco, sulindaco, suprofeno, ácido tiaprofénico, tiopinaco, tiopaprofeno, ácido tolfenámico, tolmetina, tolmetina, zidometacina, zomepirac y zomepirac); y (21) productos terapéuticos antioxidantes en aerosol, tal como S-nitrosoglutatión.

1.2.2.12 Agentes antidiabéticos

Los péptidos agonistas de GCC descritos en el presente documento se pueden usar en combinación terapéutica con uno o más agentes antidiabéticos, incluyendo, pero sin limitación: agonistas de PPAR γ tales como glitazonas (por ejemplo, WAY-120.744, AD 5075, balaglitazona, ciglitazona, darglitazona (CP-86325, Pfizer), englitazona (CP-68722, Pfizer), isaglitazona (MIT/J&J), MCC-555 (Mitsubishi divulgado en el documento US5594016), pioglitazona (tal como Actos™ pioglitazona; Takeda), rosiglitazona (Avandia™, Smith Kline Beecham), maleato de rosiglitazona, troglitazona (Rezulin®, divulgado en el documento US4572912), rivoglitazona (CS-OI 1, Sankyo), GL-262570 (Glaxo Wellcome), BRL 49653 (divulgado en el documento WO98/05331), CLX-0921, 5-BTSD, GW-0207, LG-100641, JJT-501 (JPNT/P&U), L-895645 (Merck), R-119702 (Sankyo/Pfizer), NN-2344 (Dr. Reddy/NN), YM-440 (Yamanouchi), LY-300512, LY-519818, R483 (Roche), T131 (Tularik) y similares, y los compuestos divulgados en los documentos US4687777, US5002953, US5741803, US5965584, US6150383, US6150384, US6166042, US6166043, US6172090, US6211205, US6271243, US6288095, US6303640, US6329404, US5994554, WO97/10813, WO97/27857, WO97/28115, WO97/28137, WO97/27847, WO00/76488, WO03/000685, WO03/027112, WO03/035602, WO03/048130, WO03/055867, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; biguanidas, tales como clorhidrato de metformina (clorhidrato de N,N-dimetilimidodicarbonimidico diamida, tal como Glucophage™, Bristol-Myers Squibb); clorhidrato de metformina con gliburida, tal como Glucovance™, Bristol-Myers Squibb); buformina (imidodicarbonimidico diamida, N-butil-); etoformina (1-butil-2-etilbiguanida, Schering A. G.); otras formas de sal de metformina (incluyendo cuando la sal se elige del grupo de, acetato, benzoato, citrato, ftimarato, embonato, clorofenoxiacetato, glicolato, palmoato, aspartato, metanosulfonato, maleato, paraclorofenoxiisobutirato, formiato, lactato, succinato, sulfato, tartrato, ciclohexanocarboxilato, hexanoato, octanoato, decanoato, hexadecanoato, octodecanoato, bencenosulfonato, trimetoxibenzoato, paratoluenosulfonato, adamantanocarboxilato, glicoxilato, glutarnato, pirrolidonocarboxilato, naftalenosulfonato, 1-glucosafosfato, nitrato, sulfito, ditionato y fosfato), y fenformina; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa-IB (PTP-IB), tales como A-401.674, KR 61639, OC-060062, OC-83839, OC-297962, MC52445, MC52453, ISIS 113715, y los divulgados en los documentos WO99/585521, WO99/58518, WO99/58522, WO99/61435, WO03/032916, WO03/032982, WO03/041729, WO03/055883, WO02/26707, WO02/26743, JP2002114768, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; sulfonilureas tales como acetohexamida (por ejemplo, Dymelor, Eli Lilly), carbutamida, clorpropamida (por ejemplo, Diabinese®), gliamilida (Pfizer), gliclazida (por ejemplo, Diamcron, Servier Canada Inc), glimepirida (por ejemplo, divulgada en el documento US4379785, tal como Amaryl, Aventis), glipentida, glipizida (por ejemplo, Glucotrol o Glucotrol XL de liberación prolongada, Pfizer), gliquidona, glisolamida, gliburida/glibenclamida (por ejemplo, Micronase o Glynase Prestab, Pharmacia & Upjohn y Diabeta, Aventis), tolazamida (por ejemplo, Tolinase), y tolbutamida (por ejemplo, Orinase), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de las mismas; meglitinidas, tales como repaglinida (por ejemplo, Prandin®, Novo Nordisk), KAD1229 (PF/Kissei), y nateglinida (por ejemplo, Starlix®, Novartis), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de las mismas; inhibidores de α glucósido hidrolasa (o inhibidores de glucósido) tales como acarbosa (por ejemplo, Precose™, Bayer divulgado en el documento US4904769), miglitol (tal como GLYSET™, Pharmacia & Upjohn divulgado en el documento US4639436), camiglibosa (metil 6-desoxi-6-[(2R,3R,4R,5S)-3,4,5-trihidroxi-2-(hidroximetil)piperidino]-alfa-D-glucopiranosido, Marion Merrell Dow), voglibosa (Takeda), adiposina, emiglitato, pradimicina-Q, salbostatina, CKD-711, MDL-25.637, MDL-73.945 y MOR 14, y los compuestos divulgados en los documentos US4062950, US4174439, US4254256, US4701559, US4639436, US5192772, US4634765, US5157116, US5504078, US5091418, US5217877, US51091 y WOO 1/47528 (poliaminas); inhibidores de α -amilasa, tales como tendamistat, trestatina y AI-3688, y los compuestos divulgados en los documentos US4451455, US4623714 y US4273765; inhibidores de SGLT2, incluyendo los divulgados en los documentos US6414126 y US6515117; un inhibidor de α P2, tal como se divulga en el documento US6548529; secretagogos de insulina, tales como linogirida, A-4166, forskilina, dibutiril cAMP, 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, idazoxano, earoxano y fluparoxano, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; insulina y compuestos relacionados (por ejemplo, miméticos de insulina) tales como biota, LP-100, novarapid, insulina detemir, insulina lispro, insulina largina, suspensión de insulina y cinc (lente y ultralente), insulina Lys-Pro, GLP-I (1-36) amida, GLP-I (73-7) (insulintropina, divulgada en el documento US5614492), LY-315902 (Lilly), GLP-I (7-36)-NH2, AL-401 (Autoimmune), determinadas composiciones como se divulga en los documentos US4579730,

US4849405, US4963526, US5642868, US5763396, US5824638, US5843866, US6153632, US6191105 y WO 85/05029, e insulina de primates, roedores o conejos, incluyendo variantes biológicamente activas de las mismas, que incluyen variantes alélicas, más preferentemente insulina humana disponible de forma recombinante (las fuentes de insulina humana incluyen formulaciones farmacéuticamente aceptables y estériles tales como las disponibles en Eli Lilly (Indianapolis, Ind. 46285) como Humulin™ (origen del ADN_r de insulina humana), véase también la THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, 55ª Ed. (2001) Medical Economics, Thomson Healthcare (que divulga otras insulinas humanas adecuadas); no tiazolidinadonas, tales como JT-501 y farglitazar (GW-2570/GI-262579), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de las mismas; agonistas duales de PPARα/γ, 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-dioxotiazolidinil)metil metoxi-N-[[4-(trifluorometil)fenil]metil]benzamida), L-796449, LR-90, MK-0767 (Merck/Kyorin/Banyu), SB 219994, muraglitazar (BMS), tesaglitazar (Astrazeneca), reglitazar (JTT-501) y los divulgados en los documentos WO99/16758, WO99/19313, WO99/20614, WO99/38850, WO00/23415, WO00/23417, WO00/23445, WO00/50414, WO01/00579, WO01/79150, WO02/062799, WO03/004458, WO03/016265, WO03/018010, WO03/033481, WO03/033450, WO03/033453, WO03/043985, WO 031053976, solicitud de EE.UU. N.º de Ser. 09/664.598, presentada el 18 de sept. de 2000, Murakami *et al.* Diabetes 47, 1841-1847 (1998), y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; otros fármacos sensibilizantes a la insulina; agonistas del receptor de VPAC2; moduladores de GLK, tales como los divulgados en el documento WO03/015774; moduladores de retinoides tales como los divulgados en el documento WO03/000249; inhibidores de GSK 3β/GSK 3, tales como 4-[2-(2-bromofenil)-4-(4-fluorofenil-1H-imidazol-5-il)]piridina y los compuestos divulgados en los documentos WO03/024447, WO03/037869, WO03/037877, WO03/037891, WO03/068773, EP1295884, EP1295885 y similares; inhibidores de glucógeno fosforilasa (HGLPa), tales como CP-368.296, CP-316.819, BAYR3401 y compuestos divulgados en los documentos WO01/94300, WO02/20530, WO03/037864, y sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; promotores del consumo de ATP tales como los divulgados en el documento WO03/007990; inhibidores de TRB3; ligandos del receptor vanilloide, tales como los divulgados en el documento WO03/049702; agentes hipoglucemiantes tales como los divulgados en los documentos WO03/015781 y WO03/040114; inhibidores de glucógeno sintasa cinasa 3, tales como los divulgados en el documento WO03/035663; agentes tales como los divulgados en los documentos WO99/51225, US20030134890, WO01/24786 y WO03/059870; proteína 1 de unión al ADN sensible a la insulina (IRDBP-I) como se divulga en el documento WO03/057827, y similares; antagonistas de adenosina A2 tales como los divulgados en los documentos WO03/035639, WO03/035640 y similares; agonistas de PPARδ, tales como GW 501516, GW 590735, y los compuestos divulgados en los documentos JP10237049 y WO02/14291; inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (DP-IV), tales como isoleucina tiazolidida, NVP-DPP728A (1-[[[2-[(5-cianopiridin-2-il)amino]etil]amino]acetil]-2-ciano-(S)-pirrolidina, divulgada por Hughes *et al.*, Biochemistry, 38(36), 11597-11603, 1999), P32/98, NVP-LAF-237, P3298, TSL225 (ácido triptofil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-3-carboxílico, divulgado por Yamada *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 8 (1998) 1537-1540), valina pirrolidida, TMC-2A/2B/2C, inhibidores de CD-26, FE999011, P9310/K364, VIP 0177, DPP4, SDZ 274-444, 2-cianopirrolididas y 4-cianopirrolididas como se divulga por Ashworth *et al.*, Bioorg. & Med. Chem. Lett., Vol. 6, N.º 22, págs. 1163-1166 y 2745-2748 (1996), y los compuestos divulgados en los documentos US6395767, US6573287, US6395767 (los compuestos divulgados incluyen BMS-477118, BMS-471211 y BMS 538.305), 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 la exendina 4 sintética de polipéptido de 39 aa denominada Exenatide®), y los compuestos divulgados en los documentos US2003087821 y NZ 504256, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos; péptidos, incluyendo amlintida y Symlin® (acetato de pramlintida); y activadores de glicocinasa tales como los descritos en los documentos US2002103199 (compuestos heteroaromáticos condensados) y WO02/48106 (compuestos de propionamida sustituidos con isoindolin-1-ona).

Cuando se hace referencia a una patente, solicitud de patente o publicación que contiene definiciones expresas, se debe entender que esas definiciones expresas se aplican a la patente, solicitud de patente o publicación a la que se hace referencia en la que se encuentran, y no al resto del texto de esta solicitud. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Las referencias citadas en el presente documento no se admiten como técnica anterior a la invención.

Debe entenderse que si bien la invención se ha descrito junto con las realizaciones específicas preferidas de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar la invención. La invención es como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de fragmentos protegidos con cadena lateral de SP-304 (como en el documento WO 2012/118972)

Unión de Fmoc-AA-OH a la resina 2-CITrt

La resina 2-CITrt (10 g, sustitución = 1,0 mmol/g de resina) se suspendió en 100 ml de diclorometano (DCM) durante 5 minutos y a continuación se drenó. La esterificación se realizó utilizando 1,5 equiv. de Fmoc-aminoácido y 1,7 equiv.

de diisopropiletilamina (DIEA) en 80 ml de DCM (con una cantidad mínima de dimetilformamida (DMF) para disolver completamente el aminoácido) durante 2 horas. La resina resultante se lavó con 60 ml de DCM y se tapó con 60 ml de solución de DIEA/metanol (1:9, v/v) durante 30 minutos. A continuación, la resina cargada se lavó con DCM (6 vol.) 2 veces, DMF (6 vol.) 3 veces y metil t-butiléter (MTBE) (6 vol.) 3 veces y se secó a alto vacío. La sustitución de la resina protegida con Fmoc se determinó mediante ensayo de liberación de Fmoc. Finalmente, el grupo Fmoc se desprotegió con una mezcla de piperidina al 5 %, 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno al 1 % (DBU) y N-hidroxibenzotriazol al 1 % (HOBt) en DMF (10 vol.) 2 veces, y la resina se lavó y se secó a alto vacío para dar la resina final para la síntesis peptídica. Los resultados de los experimentos se enumeran en la Tabla VIII a continuación.

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

Resina de aminoácido 2-CITrt	Escala de síntesis (mmol)	Sustitución de la resina cargada del ensayo de liberación de Fmoc	Rendimiento (Peso, % de rendimiento)
Resina H-Gly-2-CITrt	4,16	0,57 mmol/g de resina	6 g, 82 %
Resina H-Leu-2-CITrt	5,20	0,81 mmol/g de resina	6,4 g, 100 %
Resina H-Gly-2-CITrt	300	0,80 mmol/g de resina	328,6 g, 88 %
Resina H-Leu-2-CITrt	300	0,75 mmol/g de resina	338,5 g, 84 %

Síntesis de los fragmentos A y B protegidos por cadenas laterales

La resina H-Gly-2-CITrt o la resina H-Leu-2-CITrt se suspendió en DMF (10 vol.) durante 20 minutos, a continuación se drenó. La resina resultante se lavó con DMF (10 vol.) durante 5 minutos. El ensamblaje de la cadena se realizó usando la química Fmoc estándar. Generalmente, se disolvieron 1,5 equiv. de aminoácido Fmoc y 1,5 equiv. de HOBt en DMF (4,5 vol.), seguido de la adición de 1,5 equiv. de DIEA. A continuación, la solución resultante se enfrió por debajo de 5 °C con un baño de hielo-agua y se activó mediante la adición de 1,5 equiv. de HBTU. Se añadió DCM (1,5 vol.) a la resina, seguido de la adición de la solución de aminoácido Fmoc activada. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se controló la finalización de la acilación mediante la prueba de Kaiser. Si la prueba de Kaiser indicó la presencia de amina sin reaccionar después de 2 horas, se requirió el reacoplamiento con el mismo protocolo usando 1,0 equiv. de aminoácido Fmoc, 1,0 equiv. de HOBt y 1,0 equiv. de la DIEA. La protección se logró generalmente acetilando la amina que no había reaccionado con una mezcla de solución de anhídrido acético/piridina/DMF. La secuencia peptídica se ensambló repitiendo el procedimiento de protección anterior con los correspondientes derivados de aminoácidos Fmoc en la secuencia del extremo C al extremo N. El acoplamiento del residuo Fmoc-Cys(Trt)-OH o Fmoc-Cys(Acm)-OH se logró usando 2,0 equiv. de Fmoc-Cys(Trt)-OH o Fmoc-Cys(Acm)-OH, 2,0 de equiv. de HOBt y 2,0 equiv. de DIC con activación *in situ* en el protocolo de DCM/DMF para minimizar la racemización de cisteína.

Una vez completada la etapa sintética, la resina peptídica se lavó minuciosamente con DMF (10 vol.), MTBE (10 vol.), DMF (10 vol. 3 veces) y MTBE (10 vol. 3 veces) y posteriormente se secó en una estufa de vacío hasta un peso constante.

El péptido protegido con cadena lateral se escindió de la resina usando TFA al 1 %/DCM (10 vol.) 3 veces, durante 5 minutos cada vez, y las fracciones de escisión se recogieron en piridina cada vez (relación de volumen 1:1 con respecto a TFA en cada fracción de escisión). La resina peptídica se lavó con DCM (7,5 vol.). Las fracciones se combinaron y se concentraron al vacío hasta el 10 % del volumen original, y la solución resultante se reconstituyó con etanol (3 vol.) y se concentró hasta el 50 % del volumen original. Finalmente, el péptido se eliminó por precipitación mediante la adición de agua (1 vol.). El sólido se recogió mediante filtración al vacío o centrifugación y se lavó con agua dos veces. El producto se secó al vacío hasta un peso constante y se sometió a análisis por HPLC y ES-MS. Los resultados de los experimentos se presentan en la Tabla IX a continuación.

Tabla IX. Preparación de los fragmentos A y B

Fragmento	Escala de síntesis (mmol)	Peso final de la resina peptídica y rendimiento a partir del aumento de peso de la resina	Rendimiento del fragmento obtenido (% de rendimiento)	Pureza (HPLC)	Masas de fragmentos calculadas/observadas*
FmocAA7-14OH (1)	3,4	9,5 g, 66,4 %	3,337 g (61,3 %)	87,8 %	1599,95/1598,86
BocAA1-6OH (2)	5,2	11,8 g, 76,3 %	5,896 g (76,9 %)	94,6 %	1474,80/1473,94
FmocAA7-14OH (1')	200	479,7 g, 74,4 %	213,7 g (66,8 %)	90,1 %	1599,95/1598,81
BocAA1-6OH (2')	200	544,0 g, 101,3 %	247,0 g (83,7 %)	94,2 %	1474,80/1473,94

*Calculada = masa molecular promedio; Observada = masa monoisotópica por ES-MS

Ejemplo 2: Condensación de fragmentos de SP-304 en solución (como en el documento WO 2012/118972)

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

Una solución de Fmoc-Cys(Acm)-OH (124,38 g, 0,3 mol), H-Leu-OtBu.HCl (67,12 g, 0,3 mol) y HOBt (40,54 g, 0,3 mol) en DMF (600 ml) se enfrió a -5 °C. Se añadió hexafluorofosfato de 2-[1H-benzotriazol-1-il]-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) (113,79 g, 0,3 mol) y se disolvió completamente. Se añadió gota a gota DIEA (183,1 ml, 1,05 mol) durante un periodo de 105 minutos a la misma temperatura con buena agitación, manteniendo el pH de la mezcla entre 6 y 7. La agitación se continuó durante 15 minutos a 0 °C y la reacción se controló con TLC. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (EtOAc) (600 ml) y H₃PO₄ al 5 % (300 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (600 ml). Los extractos combinados se lavaron con H₃PO₄ al 5 % (2 veces), H₂O (1 vez), NaHCO₃ saturado (3 veces), H₂O (2 veces) y salmuera (2 veces). La solución se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó al vacío a sequedad. El producto se recrystalizó en éter de petróleo/EtOAc (3:1) y se secó: 166,75 g (rendimiento del 95,0 %, pureza del 99,0 %).

Se disolvió Fmoc-Cys(Acm)-Leu-OtBu (166,75 g, 0,277 mol) en una solución al 10 % de piperidina/DCM (810 ml) con agitación. La reacción se controló con TLC. Después de que la reacción se completara en 3 horas, el disolvente y los materiales volátiles se eliminaron usando un evaporador rotatorio. El material oleoso obtenido se trituró con éter de petróleo para eliminar los subproductos por decantación. El residuo, un jarabe, se recogió en EtOAc, y se lavó con una solución mixta de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH = 6), a continuación NaHCO₃ saturado, H₂O purificada y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación del disolvente y los materiales volátiles produjo un producto oleoso H-Cys(Acm)-Leu-OtBu (1-1) (73,23 g, rendimiento: 73,1 %, pureza: 98,0 %).

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

Una solución de Fmoc-AA7-14OH (1') (198,3 g, 124,0 mmol), H-AA15-16OtBu (1-1) (52,3 g, 148,8 mmol) y Cl-HOBt (21,0 g, 124,0 mmol) en DMF (2500 ml) se enfrió a -5 °C. Se añadió HBTU (51,7 g, 136,4 mmol) y se disolvió completamente. A continuación, se añadió DIEA (54,1 ml, 310 mmol) con agitación, manteniendo el pH de la mezcla entre 6 y 7. La agitación se continuó durante 30 minutos a 0-5 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta 20-27 °C y la agitación se continuó durante una hora y media. A continuación, la mezcla se vertió en HCl ac. 0,5 N enfriado previamente (10-20 °C) (20 l). La suspensión se almacenó a 20-25 °C durante 45 minutos. El sólido se recogió filtrando la suspensión a través de un embudo con frita de vidrio de porosidad media y con un lavado posterior con HCl ac. 0,5 N (3500 ml, 2 veces), agua purificada (3500 ml), NaHCO₃ ac. saturado (3500 ml, 2 veces) y agua purificada (3500 ml, 2 veces) y éter dietílico (2000 ml, 2 veces). Finalmente, el péptido en bruto húmedo FmocAA7-16OtBu se secó en un desecador a alto vacío a temperatura ambiente para producir 238,22 g de producto (pureza, 85,27 %, rendimiento del 98,9 %).

A una solución de FmocAA7-16OtBu (234,88 g, 120,9 mmol) en DMF (2350 ml) se le añadió piperidina (123 ml, 1245,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante dos horas y media y, a continuación, la mezcla se vertió en n-hexano (20,0 l). El precipitado pegajoso resultante se trituró con n-hexano (3500 ml, 7 veces). El precipitado pegajoso se disolvió en una cantidad mínima de DMF (2000 ml) y a continuación se vertió en HCl ac. 0,5 N (10 vol.). El sólido se recogió por filtración y se lavó con agua purificada (3 veces), a continuación con éter dietílico (3000 ml, 3 veces), se secó al aire durante una noche y a continuación se secó al vacío para dar el producto (2-3) (HAA7-16OtBu) (183,67 g, pureza: 68,4 %, % de rendimiento: 88,33 %, ES-MS, PM: calculado = 1721,2, observado = 1719,84).

Síntesis de A-B-C completamente protegido: BocAA1-16OtBu (3-3)

Una solución de HAA7-16OtBu (2-3) (183,67 g, 106,71 mmol), Se enfriaron BocAA1-6-OH (2') (157,65 g, 106,71 mmol) y 6-Cl-HOBt (18,141 g, 106,71 mmol) en DMF (3 l) entre -3 y 0 °C. Se añadió HBTU (44,523 g, 117,38 mmol) y se disolvió completamente. A continuación, se añadió DIEA (55,8 ml, 320,13 mmol) con agitación, manteniendo el pH de la mezcla a 6. La agitación se continuó durante 20 minutos entre -5 y 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta 25 °C y la agitación se continuó durante 2,5 horas, seguido de una adición adicional de HBTU (4,048 g, 10,671 mmol) y DIEA (2 ml). La agitación se continuó durante 1,5 horas más. La mezcla resultante se vertió en MeOH (15 l), y el precipitado se recogió y se lavó con una mezcla de MeOH/DMF (5:1, v/v) (2 veces, 3 l), HCl 0,1 N (3 l, 2 veces), NaHCO₃ saturado (2 veces), agua purificada (3 veces), éter dietílico (2 veces) y se secó al vacío para producir el producto BocAA1-16OtBu (3-3) (278,0 g, rendimiento del 82,0 %. Nota: la pureza se determinó después de la desprotección).

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

Una mezcla de TFA/TIS/EDT (8:1:1, 2400 ml) se enfrió a (0-5 °C) en una atmósfera de nitrógeno y se añadió en porciones Boc-AA1-16OtBu (3-3) (201 g). La suspensión resultante se agitó a 0-10 °C durante 30 min, a continuación la solución de reacción se dejó calentar hasta 20-25 °C con un baño de agua (10 minutos) y se continuó la agitación durante 1 h y 50 min más a la misma temperatura. La mezcla de reacción se vertió en MTBE (18 l) enfriado previamente (10 °C). Se desprendió algo de calor durante la adición de la solución de péptido/TFA y la temperatura

interna subió a 25 °C. A continuación, la suspensión resultante se almacenó en un baño de hielo-agua (5-10 °C) durante 40 min. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con MTBE (2000 ml, 4 veces) y se secó al vacío sobre P₂O₅, produciendo 148,37 g de un producto de color blanquecino, HAA1-16OH (4-4) (pureza: 62,23 %, ES-MS, PM: calculado = 1828,07, observado = 1826,67).

Ejemplo 3: Ciclación oxidativa y purificación de SP-304 mediante resina absorbente poliestirénica (como en el documento WO 2012/118972)

Se disolvió HAA1-16OH (4-4) (0,58 g) en 5 ml de acetonitrilo y se diluyó con 575 ml de agua purificada. La solución se ajustó a pH 8-9 con una solución al 25 % de amoníaco y se añadió peróxido de hidrógeno al 3 % (0,58 ml), a continuación la mezcla de reacción se mantuvo durante una hora controlando la formación de disulfuro mediante HPLC. A continuación se pasó nitrógeno a través de la mezcla de reacción y la solución se acidificó a pH 3-4 con ácido acético (HPLC al 71,8 %, recuperación estimada del 98,5 % a partir del área del pico). A la mezcla resultante se le añadió gota a gota yodo al 1 %/ACN durante un período de 10 minutos con buena agitación hasta que persistió el color amarillo del yodo. La agitación se continuó durante 30 minutos a 17-20 °C. El yodo se inactivó mediante la adición de ácido ascórbico ac. 0,5 M hasta que el color amarillo desapareció. A continuación, el pH de la mezcla se ajustó a 6-7 con una solución al 25 % de amoníaco (HPLC al 51,0 %, recuperación estimada del 50 % a partir del área del pico).

La resina absorbente poliestirénica (D101) se empaquetó en una columna de 3 (DI) x 9 (L) CM y se equilibró bien con 6 volúmenes de columna (VC) de etanol, 4 VC de agua purificada, 2 VC de HCl ac. al 5 %, 4 VC de agua purificada, 2 VC de NaOH ac. al 2 % y 4 VC de agua purificada al caudal de 3 VC/hora. A continuación, la solución peptídica oxidada se cargó en la columna a 2 VC/h. Tras la carga, la columna se lavó con 2 VC de agua purificada a 2 VC/h. La elución se realizó aplicando etanol acuoso al 80 % a la columna a razón de 2 VC/h. Las fracciones con absorbentes de UV a 215 nm se recogieron y se combinaron (125 ml). A continuación, las fracciones combinadas se evaporaron al vacío hasta el 10 % del volumen original y la suspensión se precipitó con 125 ml de MTBE frío (10 vol). El sólido se recogió por filtración y se secó al vacío para producir el SP-304 en bruto (0,282 g, HPLC al 55,0 %).

Ejemplo 4: Ciclación oxidativa y purificación de SP-304 por RP-HPLC (como en el documento WO 2012/118972)

El péptido en bruto (4-4), preparado como se describe en el Ejemplo 2, se disolvió en ACN acuoso al 10 % hasta una concentración aproximada de 1,25 g/l con agitación continua mediante un agitador mecánico. El pH de la solución peptídica se ajustó a 8,5-9,0 con amoníaco acuoso al 20 % y la solución resultante se agitó vigorosamente abierta a la atmósfera. Se añadió peróxido de hidrógeno (3 %, 0,25 equiv.) y se continuó agitando a temperatura ambiente durante 60 minutos. El análisis por HPLC mostró un consumo completo del péptido lineal. A continuación, la solución se acidificó a pH 3-4 con AcOH acuoso al 10 %. La solución resultante se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 1 g/l con agua purificada. Se añadió yodo (1,3 % en ACN) con agitación vigorosa durante un período de 10 minutos hasta que persistió el color amarillo del yodo. A intervalos de aproximadamente media hora se tomaron muestras de la mezcla y se analizaron mediante RP-HPLC. El pico del péptido monociclado disminuyó gradualmente y surgió un nuevo pico (péptido diciclado). La oxidación se completó cuando no quedó ningún pico de péptido monociclado. El exceso de yodo se neutralizó con una pequeña cantidad de ácido ascórbico. La solución resultante se cargó en una columna de RP-HPLC C₁₈ rellena con gel de sílice Kromasil 100 Å de 10 µm. Después de cargar la solución de péptido diciclado, se cargaron 3 volúmenes de columna de una solución de fase móvil A al 90 % (TEA al 1,0 %, H₃PO₄ al 0,5 % en H₂O, pH = 7) y fase móvil al 10 % (acetonitrilo) para limpiar las líneas. A continuación, se operó un gradiente del 10 % de B al 30 % B en 80 minutos. Se recogieron fracciones a intervalos registrados cuando el pico principal comenzó a eluir. La pureza de cada fracción se controló mediante RP-HPLC analítica. Las fracciones de pureza ≤95 % (que no cumplieran con los criterios del grupo principal) se agruparon por consiguiente y se procesaron usando el mismo sistema de tampón y los mismos parámetros de elución en gradiente indicados anteriormente. Todas las fracciones con una pureza ≥95 % se agruparon y se almacenaron a 2-8 °C. La solución peptídica purificada se diluyó en una relación de 1:1 con agua purificada y a continuación se cargó en la misma columna de RP-HPLC. El intercambio de contraiones se logró lavando la columna con 2-3 volúmenes de columna de acetato de amonio acuoso 0,5 M, seguido de elución en gradiente del 90 % de C (solución acuosa al 0,2 % de AcOH) y el 10 % de fase móvil D (ACN) al 50 % de fase móvil C y el 50 % de fase móvil D en 50 minutos. Las fracciones se recogieron a intervalos registrados y se controlaron mediante RP-HPLC analítica. Las fracciones (≥95 %) se recogieron y se liofilizaron para obtener el péptido seco final, 68,0 g (96,1 % de pureza).

Ejemplo 5: Desalinización y aislamiento de SP-304 después de la purificación por RP-HPLC (como en el documento WO 2012/118972)

Después de purificar la plecanatida mediante RP-HPLC como se describe en el Ejemplo 4, se desalinizó y se aisló. Brevemente, la plecanatida purificada en tampón de acetato de amonio/acetonitrilo/agua se cargó en una columna rellena con absorbente polimérico (resina de adsorción macroporosa) y a continuación se eluyó con una mezcla de alcohol/agua. Finalmente, la solución de alcohol peptídico se concentró a presión reducida, se precipitó con un éter, por ejemplo, éter dietílico o MTBE, y se secó al vacío para dar el producto final.

Cribado de la resina (adsorbentes poliméricos)

Pretratamiento de resina: Los adsorbentes poliméricos, DA201-C (de Jiangsu Suqing, China; poliestireno reticulado; área superficial 1200-1400 m²/g; diámetro de poro promedio: 3-4 nm; volumen de poro: 1,1-1,2 ml/g; densidad aparente: 0,68-0,75 g/ml; densidad específica: 1,03-1,1 g/ml; humedad: 50-60 %; tamaño de partícula: 0,315~1,25 mm ≥ 95 %; diámetro efectivo: 0,4-0,7 mm; coeficiente de uniformidad: $\leq 1,6$ %), DA201-H (de Jiangsu Suqing, China; poliestireno reticulado; área superficial ≥ 800 m²/g; diámetro de poro promedio: 6-8 nm; volumen de poro: 1,5-1,8 ml/g; densidad aparente: 0,65-0,70 g/ml; densidad específica: 1,02-1,07 g/ml; humedad: 55-65 %; tamaño de partícula: 0,315~1,25 mm ≥ 95 %; diámetro efectivo: 0,4-0,7 mm; coeficiente de uniformidad: $\leq 1,6$ %), ADS-5 (de Nankai Hecheng, China; poliestireno reticulado; área superficial 520-600 m²/g; diámetro de poro promedio: 25-30 nm; densidad aparente: 0,7-0,8 g/ml; humedad: 60-70 %; tamaño de partícula: 0,315~1,25 mm ≥ 95 %; coeficiente de uniformidad: $\leq 1,6$ %), y ADS-8 (de Nankai Hecheng, China; poliestireno reticulado; área superficial 450-500 m²/g; diámetro de poro promedio: 12-16 nm; densidad aparente: 0,65-0,75 g/ml; humedad: 60-70 %; tamaño de partícula: 0,315~1,25 mm ≥ 95 %; coeficiente de uniformidad: $\leq 1,6$ %) se suspendieron en 4-6 volúmenes de etanol durante una noche. Decantar o aspirar el sobrenadante de la resina sedimentada. Añadir 6-8 volúmenes de agua desionizada y suspender de nuevo la resina con agitación superior suave. De nuevo, decantar o aspirar el sobrenadante de la resina sedimentada. Repetir las etapas anteriores de tratamiento de agua y decantación hasta que el aspecto de los finos sea mínimo.

Empaquetamiento y regeneración de columnas: Resuspender las resinas tratadas previamente anteriormente con 1-2 volúmenes de agua desionizada para formar la suspensión de resina respectivamente usando agitación suave. Verter la suspensión de resina lentamente por el interior de la columna para evitar que quede aire atrapado. Después de que la suspensión de resina se haya transferido completamente a la columna, aclarar el interior de la columna con una botella con atomizador que contenga agua desionizada. Abrir la salida de la columna desde un lecho de resina sedimentado (DI = 4 cm, A = 10 cm). A continuación, los lechos de resina se lavaron sucesivamente a un caudal de 3 VC por hora por 4 VC de agua desionizada, 2 VC de HCl ac. al 5 %, 4 VC de agua desionizada, 2 VC de NaOH ac. al 2 % y finalmente 4 VC de agua desionizada hasta alcanzar el pH de aproximadamente 7.

Preparación de muestras de carga: Se disolvieron 2000 mg de plecanatida liofilizada en una mezcla de 60 ml de ACN y 150 ml de AcOH ac. al 0,2 % (el pH del AcOH ac. se ajustó a 4 con amoníaco ac. al 10 %). Después de la filtración con membrana de nylon de 1,2 μ m, el filtrado se diluyó hasta 250 ml con AcOH ac. al 0,2 % (pH 4) y se dividió en 4 partes (62,5 ml cada una) para la carga.

Carga de la muestra en las columnas: Se cargaron 62,5 ml de la solución peptídica anterior en las 4 columnas anteriores a un caudal de 2 VC/h, respectivamente. El eluido de carga se recogió y se ensayó mediante RP-HPLC para evaluar la capacidad absorbente de cada resina. Los resultados de la capacidad absorbente de cada resina se demostraron en la Tabla X a continuación.

Tabla X

Resinas	Péptido en muestra de carga	Péptido absorbido	Relación absorbente
DA201-C	500 mg	303,5 mg	60,7 %
DA201-H	500 mg	493,4 mg	98,7 %
ADS-5	500 mg	450,5 mg	90,1 %
ADS-8	500 mg	466,1 mg	93,2 %

Método de HPLC: Máquina de HPLC: Shimadzu LC-10AD vp; columna: Kromasil, C18, 4,6 x 250 mm; fase móvil A: TFA al 0,1 % en agua; fase móvil B: TFA al 0,1 % en ACN; detectar a: 215 nm; temperatura de la columna: 40 °C; caudal: 1,0 ml/min; gradiente: 25 % de B al 45 % de B en 30 min.

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

Cantidad de péptido absorbido = Cantidad de péptido en la muestra de carga - Cantidad de péptido en el eluido de carga = 500 mg - 62,5 ml x (1,6 mg/ml x área del pico de HPLC del eluido/área del pico de HPLC de la solución estándar de péptido)

Lavado de la columna con agua desionizada: A continuación, las columnas cargadas anteriores se lavaron con 2 VC de agua desionizada a 2 VC/h para eliminar las sales. Los eluidos de lavado se recogieron y se analizaron mediante RP-HPLC para determinar la cantidad de péptido desorbido por el agua usando el mismo método anterior. Las relaciones de péptidos desorbidos de cada resina se enumeran en la Tabla XI a continuación.

Tabla XI

Resinas	Péptido absorbido en resina	Péptido desorbido	Relación de desorción
DA201-C	303,5 mg	184,5 mg	60,8 %
DA201-H	493,4 mg	40,9 mg	8,3 %
ADS-5	450,5 mg	41,9 mg	9,3 %
ADS-8	466,1 mg	40,1 mg	8,6 %

Desorción del péptido con etanol al 90 %/agua: Después de 2 VC de lavados con agua, el péptido absorbido en cada columna se eluyó a continuación con 1-2 VC de etanol al 90 % en agua a razón de 2 VC/h. La elución se recogió y se analizó mediante RP-HPLC para determinar la cantidad de péptido desorbido por etanol al 90 % usando el mismo método anterior. Las relaciones de péptidos desorbidos de cada resina se enumeran en la Tabla XII a continuación.

Tabla XII

Resinas	Péptido absorbido en resina después de 2 VC de lavados con agua	Péptido desorbido	Relación de desorción
DA201-C	119,0 mg	47,6 mg (mediante 2 VC de etanol)	40 %
DA201-H	452,5 mg	452,5 mg (mediante 1,5 VC de etanol)	100 %
ADS-5	408,6 mg	408,6 mg (mediante 1,5 VC de etanol)	100 %
ADS-8	426,0 mg	426,0 mg (mediante 1,5 VC de etanol)	100 %

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

Tabla XIII

Resinas	Péptido en muestra de carga	Producto final obtenido	Rendimiento general
DA201-C	500 mg	52 mg	10,4 %
DA201-H	500 mg	460 mg	92,0 %
ADS-5	500 mg	400 mg	80,0 %
ADS-8	500 mg	430 mg	86,0 %

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

Optimización de procesos de desalinización y aislamiento

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

Tabla XIV

Disolvente	Solubilidad
IPA al 90 %/Agua	67,5 mg/ml
IPA al 75 %/Agua	596,1 mg/ml
IPA al 50 %/Agua	635,0 mg/ml
EtOH al 90 %/agua	302,0 mg/ml
EtOH al 75 %/agua	700,0 mg/ml

El agua de la solución peptídica/alcohol se puede eliminar mediante destilación azeotrópica. La Tabla XV muestra la

propiedad de los azeótropos binarios de etanol/agua e isopropanol/agua.

Tabla XV

Componente A	Componente B	Punto de ebullición A	Punto de ebullición B	Punto de ebullición del azeótropo	% en peso del azeótropo A
Agua	Etanol	100 °C	78,3 °C	78,2 °C	4 %
Agua	Isopropanol	100 °C	82,3 °C	80,3 °C	12,6 %

- 5 La degradación de plecanatida se producirá durante el almacenamiento prolongado de la solución de péptido/alcohol/agua y el proceso de concentración. La Tabla XVI demuestra los datos de estabilidad de la plecanatida en solución de IPA al 75 %/agua y EtOH al 90 %/agua a 23 °C.

Tabla XVI

Duración	Pureza (en EtOH ac. al 90 %)*	Pureza (en IPA ac. al 75 %)*
0 horas	98,5 %	98,7 %
2 horas	98,4 %	98,7 %
4 horas	N/D	98,3 %
6 horas	98,1 %	97,5 %
8 horas	N/D	96,6 %
10 horas	95,5 %	N/D
24 horas	92,0 %	N/D
25 horas	N/D	96,1 %

* *Método de HPLC:* Máquina de HPLC: Shimadzu LC-10AD vp; columna: Kromasil, C18, 4,6 x 250 mm; fase móvil A: TFA al 0,1 % en agua; fase móvil B: TFA al 0,1 % en ACN; detectar a: 215 nm; temperatura de la columna: 40 °C; caudal: 1,0 ml/min; gradiente: 25 % de B al 45 % de B en 30 min.

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

Se realizaron experimentos de elución usando mezclas de isopropanol/agua con diferentes % v/v. La relación de desorción y el contenido de agua de los eluidos peptídicos se enumeran en la Tabla XVII a continuación.

Tabla XVII

% v/v de IPA/agua	IPA al 75 %/agua	IPA al 95 %/agua	IPA al 100 %/agua
Contenido de agua en el péptido	65,9 %	53,0 %	49,8 %
Relación de desorción	100 %	100 %	90 %

Isopropanol al 75 %/agua como solución de elución: Se disolvieron 500 mg de plecanatida (98,1 % de pureza) en una mezcla de 16 ml de ACN y 49 ml de AcOH acuoso al 0,2 % (el pH de la solución al 0,2 % de AcOH se ajustó a 4,0 mediante la adición de NH₄OH ac. al 10 %). Después de la filtración con una membrana de nylon de 1,2 µm, la solución peptídica se cargó en una columna rellena con resina DA201-H (DI = 4 cm, A = 10 cm, rellena y tratada previamente mediante el procedimiento mencionado previamente) a razón de 2 VC/h. Tras la carga, la columna se lavó con 2 VC de agua desionizada a razón de 2 VC/h. A continuación, el péptido se eluyó mediante 1,5 VC del IPA al 75 %/agua a razón de 2 VC/h. La elución se controló por RP-HPLC. El eluido se recogió (124 ml, 98,3 % de pureza). El análisis de Karl Fisher indicó el agua (65,9 % en peso). En un matraz de fondo redondo de 500 ml y 1 boca se colocaron 124 ml de eluido de péptido/IPA/agua recogido anteriormente (97,6 % de pureza, se produjo una ligera degradación durante el almacenamiento a 2-8 °C durante 2 días). A continuación, el matraz se puso a presión reducida (60 Pa) en un evaporador rotatorio y se sumergió parcialmente en un baño de agua a 23 °C. Se formó una suspensión de color blanquecino al extraer aproximadamente 622 ml de isopropanol en 2 horas hasta aproximadamente 1/3 del volumen inicial de la solución (97,7 % de pureza). El análisis de Karl Fisher indicó el agua (0,17 % en peso). Al concentrado se le añadieron 350 ml de éter dietílico enfriado previamente, el sólido se recogió mediante centrifugación a 3500 rpm durante 3 minutos y se secó al vacío para producir 333 mg de producto final (rendimiento del 66,6 %, pureza por HPLC del 97,2 %).

Isopropanol al 95 %/agua como solución de elución I: Se disolvieron 500 mg de plecanatida (98,1 % de pureza) en una mezcla de 16 ml de ACN y 49 ml de AcOH acuoso al 0,2 % (el pH de la solución al 0,2 % de AcOH se ajustó a

4,0 mediante la adición de NH_4OH ac. al 10 %). Después de la filtración con una membrana de nylon de 1,2 μm , la solución peptídica se cargó en una columna rellena con resina DA201-H (DI = 4 cm, A = 10 cm, tratada previamente mediante el procedimiento mencionado previamente) a razón de 2 VC/h. Tras la carga, la columna se lavó con 2 VC de agua desionizada a razón de 2 VC/h. A continuación, el péptido se eluyó mediante 1,5 VC del IPA al 95 %/agua a razón de 2 VC/h. La elución se controló por RP-HPLC. El eluido se recogió (117 ml, 98,1 % de pureza). El análisis de Karl Fisher indicó el agua (52 % en peso). En un matraz de fondo redondo de 500 ml y 1 boca se colocaron 117 ml del eluido de péptido/IPA/agua recogido anteriormente. A continuación, el matraz se puso a presión reducida (50 Pa) en un evaporador rotatorio y se sumergió parcialmente en un baño de agua a 23 °C. Se formó un sólido blanquecino al extraer aproximadamente 470 ml de isopropanol en 130 minutos (97,9 % de pureza). Al sólido anterior se le añadieron 50 ml de éter dietílico enfriado previamente para formar una suspensión y se evaporó a presión reducida (50 Pa) en un evaporador rotatorio a 23 °C a sequedad. El rendimiento fue de 430 mg de producto final (86 %). La pureza por HPLC fue del 97,9 %.

Isopropanol al 95 %/agua como solución de elución II: Se disolvieron 500 mg de plecanatida (98,1 % de pureza) en una mezcla de 16 ml de ACN y 49 ml de AcOH acuoso al 0,2 % (el pH de la solución al 0,2 % de AcOH se ajustó a 4,0 mediante la adición de NH_4OH ac. al 10 %). Después de la filtración con una membrana de nylon de 1,2 μm , la solución peptídica se cargó en una columna rellena con resina DA201-H (DI = 4 cm, A = 10 cm, rellena y tratada previamente mediante el procedimiento mencionado previamente) a razón de 2 VC/h. Tras la carga, la columna se lavó con 2 VC de agua desionizada a razón de 2 VC/h. A continuación, el péptido se eluyó mediante 1,5 VC del IPA al 95 %/agua a razón de 2 VC/h. La elución se controló por RP-HPLC. El eluido se recogió (118 ml, 98,2 % de pureza). El análisis de Karl Fisher indicó el agua (53 % en peso). En un matraz de fondo redondo de 500 ml y 1 boca se colocaron 118 ml del eluido de péptido/IPA/agua recogido anteriormente. A continuación, el matraz se puso a presión reducida (50 Pa) en un evaporador rotatorio y se sumergió parcialmente en un baño de agua a 23 °C. Se formó una suspensión de color blanquecino (~40 ml) al extraer aproximadamente 330 ml de isopropanol en 100 minutos (97,7 % de pureza). A la suspensión anterior se le añadieron 400 ml de éter dietílico enfriado previamente para formar una suspensión. Después de reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, el sólido se recogió mediante centrifugación a 3500 rpm durante 3 minutos y se secó al vacío para producir 370 mg de producto final. El rendimiento fue del 74 %. La pureza por HPLC fue del 97,9 %.

Isopropanol al 95 %/agua como solución de elución III: Se desalinizaron y se precipitaron 10 g de plecanatida de una manera similar a la descrita anteriormente. De manera interesante, el rendimiento de la precipitación mejoró al 93 %, lo que supone un aumento significativo del rendimiento. La pureza por HPLC después de la precipitación fue del 98,47 %.

Ejemplo 6: Caracterización de SP-304 liofilizado y SP-304 precipitado (como en el documento WO 2012/118972)

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

	Acetamida	TFA	Ion amonio	Acetonitrilo
Plecanatida liofilizada	356 ppm	0,14 %	1,58 %	40 ppm
Plecanatida precipitada	<28 ppm (LOQ del método)	0,09 %	0,23 %	No detectado (LOQ de 20 ppm)

Como lo demuestran los resultados anteriores, el proceso de precipitación proporcionó niveles significativamente reducidos de impurezas de proceso indeseables.

Se midieron la plecanatida purificada mediante liofilización como se describe en el Ejemplo 4 y la plecanatida purificada mediante precipitación como se describe en el Ejemplo 5 para obtener sus densidades aparentes, densidades de compactación, distribución del tamaño de partícula y forma.

EQUIPO: (1) Medidor de densidad de compactación modelo TD-1020; (2) separador de tamiz sónico modelo L3P; (3) microscopio óptico LINITRON 2850.

MÉTODOS:

1) Mediciones de densidad aparente y de compactación: Método USP 1 modificado

a. Se usó una probeta graduada de 100,0 ml para la plecanatida liofilizada

b. Se usó una probeta graduada de 10,0 ml para la plecanatida precipitada

2) Análisis de distribución del tamaño de partícula

a. Cribas usadas: mallas de 200, 140, 100, 60, 40 y 30.

b. Tamaño de muestra: 2 g de plecanatida liofilizada y 6,4 g de plecanatida precipitada

3) Análisis microscópico óptico: Tamaño y forma de las partículas

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

b. Ampliación: 100 veces

c. En condiciones de luz normal (sin filtros polarizados)

RESULTADOS:

(1) *Aspecto físico*: La plecanatida liofilizada es un polvo ligero, esponjoso y de color blanco. La plecanatida precipitada es un polvo de color ligeramente blanquecino.

(2) *Densidad aparente y de compactación*: La Tabla XVIII proporciona datos de densidad aparente y de compactación para muestras de plecanatida tanto liofilizadas como precipitadas:

Tabla XVIII

Muestra de plecanatida	Densidad aparente, g/ml	Densidad de compactación, g/ml
Liofilizada, Lote 101221	0,0332	0,0680
Precipitada, Lote 120210	0,486	0,641

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

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

Tabla XIX

N.º del tamaño de malla	Tamaño de partícula (µm)	Peso retenido (g)		Porcentaje retenido	
		Liofilizada	Precipitada	Liofilizada	Precipitada
30	600	0,07	0,45	3,6 %	7,1 %
40	425	0,26	0,17	13,3 %	2,7 %
60	250	0,17	0,67	8,7 %	10,5 %
100	150	0,51	2,08	26,0 %	32,7 %
140	106	0,65	1,22	33,2 %	19,2 %
200	75	0,24	0,68	12,2 %	10,7 %
Pan	<75	0,06	1,09	3,1 %	17,1 %
	Total	1,96	6,36	100,0 %	100,0 %

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

(4) *Tamaño y forma de las partículas*: Las figuras 2 y 3 proporcionan análisis microscópicos ópticos de muestras de plecanatida liofilizada y precipitada, respectivamente. Como se observa en la figura 2, la plecanatida liofilizada está en forma amorfa y tiene formas irregulares de las partículas. Forman agregados físicos con partículas superpuestas. En la figura 3, la plecanatida precipitada muestra partículas individuales distinguibles. Por aspecto y forma de las

partículas, la plecanatida precipitada tendrá mejores propiedades de flujo y, por lo tanto, puede facilitar el procesamiento sólido durante la fabricación.

Las formas liofilizada y precipitada de plecanatida han mostrado aspectos y propiedades físicas distinguibles mediante análisis de densidad, distribución del tamaño de partícula y forma. La forma precipitada es más adecuada para el procesamiento de formas farmacéuticas sólidas durante la fabricación en términos de reducir la generación de polvo, menos adherencia al equipo de procesamiento y potencialmente menos pérdidas de procesamiento.

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

Ejemplo 7: Formulación de dosis bajas de SP-304 precipitado (como en el documento WO 2012/118972)

La plecanatida purificada mediante precipitación como se describe en el Ejemplo 5 se procesa adicionalmente para preparar formulaciones de dosis bajas como se describe a continuación.

Composición del lote de mezcla en seco

Artículo N.º	Ingrediente	% de concentración p/p
1	SP-304	0,3246
2	Celulosa microcristalina (Avicel PH 102)	99,43
3	Estearato de magnesio	0,2500
4	Cubiertas de cápsulas de HPMC	n/d
	Total	100

Mezcla:

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

Encapsulación

Se configura un llenador de cápsulas MG2 Planeta. Se determina el peso promedio de las cubiertas de las cápsulas vacías y se calcula el peso objetivo de llenado de las cápsulas ($\pm 5\%$). La mezcla del proceso anterior se añade a la tolva del llenador de cápsulas y se inicia la encapsulación. Los parámetros de peso de ejecución se ajustan manualmente. A continuación, las cápsulas resultantes se clasifican de acuerdo con el peso de llenado objetivo.

Compresión

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

Ejemplo 8: Síntesis y purificación de SP-304 mediante intercambio de disolventes-liofilización

Monociclación del péptido en bruto lineal: El enlace disulfuro entre Cys⁴ y Cys¹² se formó primero mediante oxidación de H₂O₂ a un pH de 8,0-8,5 para formar el péptido en bruto monociclado. El péptido en bruto lineal se añadió lentamente y se disolvió en acetato de amonio al 0,5 % en tampón de agua con H₂O₂ añadido previamente en una relación de 100:9 gramos de péptido por ml de H₂O₂ para producir una concentración en bruto final de aproximadamente 1,0 mg/ml. A continuación, el pH de la solución se ajustó a 8,5 con una solución de NH₄OH mientras se agitaba al aire libre. La reacción de monociclación oxidativa se controló usando el método de HPLC 2. Cuando el % de área del péptido en bruto lineal fue de ≤5,0 % del % de área del péptido monociclado, la reacción de oxidación se detuvo ajustando el pH de solución de péptido a 1,7-2 usando una solución de TFA. A continuación, la solución peptídica se transfirió a la siguiente etapa para la formación del péptido dicitado.

Dicitación del péptido monociclado: El enlace disulfuro entre Cys⁷ y Cys¹⁵ se formó con I₂ al 3,0 % (p/v) en solución de acetonitrilo. El puente disulfuro se creó al mismo tiempo que se eliminaron los grupos protectores de la cadena lateral de Acm presentes en los residuos de Cys restantes. La reacción de dicitación oxidativa se controló usando el método de HPLC 2. El exceso de yodo se inactivó con una solución de ácido ascórbico 0,1 M en agua. Una vez completada la reacción, el péptido dicitado se ajustó a pH 6,5-7 usando una solución de NH₄OH y el material se preparó para la purificación primaria.

Purificación primaria del péptido en bruto dicitado: La solución peptídica en bruto dicitado resultante de las etapas de oxidación se cargó a continuación en una columna de RP-HPLC preparativa empaquetada con resina de fase inversa C₁₈ que funcionaba mediante un sistema de HPLC preparativa. El péptido se eluyó en un sistema de tampón de fosfato de trietilamina (TEAP) al 1 % en agua, pH 7/ACN. Se usó el método de HPLC 1 para determinar el porcentaje de pureza de las fracciones y conjuntos obtenidos durante el análisis de purificación primaria.

Purificación de uno o más grupos de reciclaje del péptido dicitado: Después de la purificación primaria, las fracciones que requirieron purificación adicional se purificaron basándose en la pureza de los grupos de fracciones usando un sistema de tampón de TEAP al 1 % en agua, pH 7/ACN o de ácido acético al 0,2 % en agua/ACN. La solución peptídica en bruto dicitado resultante de las etapas de oxidación se cargó a continuación en una columna de RP-HPLC preparativa empaquetada con resina de fase inversa C₁₈ que funcionaba mediante un sistema de HPLC preparativa. El péptido se eluyó en un sistema de tampón de TEAP al 1 % en agua, pH 7/ACN. Se usó el método de HPLC 1 para determinar el porcentaje de pureza de las fracciones y conjuntos obtenidos durante el análisis de purificación de reciclaje.

Purificación secundaria e intercambio de sal: Después de la purificación de reciclaje, las fracciones que requirieron purificación adicional se purificaron basándose en la pureza de los grupos de fracciones usando un sistema de tampón de TEAP al 1 % en agua, pH 7/ACN o de ácido acético al 0,2 % en agua/ACN. Se usó el método de HPLC 1 para determinar el porcentaje de pureza de las fracciones y conjuntos obtenidos durante el análisis de purificación secundaria. Se usó el método de UPLC 1 para determinar el porcentaje de pureza del grupo principal obtenido durante todos los análisis de purificación antes de pasar a la siguiente etapa.

Intercambio de disolventes: El material que cumplía con los criterios del grupo principal se cargó en la columna de RP-HPLC preparativa en el extremo de la brida en la dirección inversa, se lavó con una solución 99:1 de agua con respecto a isopropanol desde la dirección inversa y se eluyó con una solución 40:60 de isopropanol:agua en dirección de avance. La solución peptídica recogida se ensayó mediante el método de UPLC 1 para determinar la pureza, a continuación, la solución peptídica se filtró, se sometió a evaporación rotatoria para eliminar el exceso de isopropanol por debajo del 5 %, seguido de liofilización en sublots durante no menos de 96 horas.

Reconstitución y liofilización final: El péptido seco liofilizado del sublot se sometió a reconstitución en agua para formar un lote homogéneo. Se añadió a la solución una cantidad del 0,5 % (p/p) de acetato de amonio al péptido seco y se mezcló hasta que se disolvió el acetato de amonio/péptido. El material se sometió a análisis mediante el método de UPLC 1 para verificar la pureza. El material disuelto se instaló en el liofilizador de bandeja y se mantuvo al vacío durante no menos de 120 horas para comprender el material peptídico seco final.

Métodos de prueba en proceso

Método de HPLC 1: Se usará el siguiente método analítico de RP-HPLC para verificar el porcentaje de pureza de HPLC de las etapas de purificación primaria y de reciclaje o del registro de lote indicado.

Parámetros de HPLC:

Columna: Waters SunFire™ C8, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm o equivalente
 Longitud de onda: 215 nm
 Fase móvil A: TEAP 0,02 M en agua a pH 6,5 (tampón analítico BA)
 Fase móvil B: ACN al 100 %
 Volumen de inyección: 5-50 µl
 Temp. de la columna: 40 °C

Parámetros de elución en gradiente:

Tiempo (min.)	Caudal (ml/min)	% de A	% de B
0,0	1,0	87,0	13,0
25,0	1,0	70,0	30,0
25,1	1,0	20,0	80,0
30,0	1,0	20,0	80,0
30,1	1,0	87,0	13,0
35,0	1,0	87,0	13,0

Método de HPLC 2: Se usará el siguiente método analítico de RP-HPLC para verificar el porcentaje de pureza de HPLC del péptido en bruto lineal y para controlar el progreso de las etapas de ciclación oxidativa.

Parámetros de HPLC:

Columna: Kromasil C18 5 μ 100 Å 4,5 x 250 mm, o equivalente
 Longitud de onda: 215 nm
 Fase móvil A: TEAP 0,02 M en agua a pH 6,5 (tampón analítico BA)
 Fase móvil B: ACN al 100 %
 Volumen de inyección: 5-50 μ l
 Temp. de la columna: 40 °C

Parámetros de elución en gradiente:

Tiempo (min.)	Caudal (ml/min)	% de A	% de B
0,0	1,0	85,0	15,0
15,0	1,0	75,0	25,0
16,1	1,0	20,0	80,0
20,0	1,0	20,0	80,0
20,1	1,0	85,0	15,0
25,0	1,0	85,0	15,0

Método de UPLC 1: Se usará el siguiente método analítico de RP-UPLC para verificar el porcentaje de pureza del grupo principal y el material peptídico del producto final antes de la liofilización.

Parámetros de UPLC:

Columna: Waters Acquity BEH C₁₈, 1,7 μ m, 150 x 2,1 mm, PIN 186002353 con una unidad de filtro en línea de columna Waters Acquity, 0,2 μ m, PIN 205000343
 Longitud de onda: 215 nm
 Fase móvil A: 48/52/0,16-MeOH/agua/TFA
 Volumen de inyección: 5 μ l
 Temp. de la columna: 10 °C

Parámetros de elución isocrática:

Tiempo (min.)	Caudal (ml/min)	% de A
0,0	0,16	100,0
85,0	0,16	100,0

Se prepararon dos lotes mediante el método descrito en el ejemplo: Lote n.º 121026 IPA2 con un tamaño de lote de 50 g y lote n.º 121026 B con un tamaño de lote de 930 g. Como se ilustra en la figura 4, el péptido IPA2 del lote n.º 121026 tenía una pureza cromatográfica por UPLC de -98 %. Otras características de los dos lotes se resumen en la Tabla XX a continuación, en comparación con los lotes preparados mediante los métodos descritos en el documento WO 2012/118972.

Tabla XX

	Proceso de liofilización de ACN (promedio o intervalo)	Proceso de liofilización de ACN (lote 101221), documento WO 2012/118972	Proceso de liofilización de ACN (lote 110425), documento WO 2012/118972	Proceso de precipitación (lote Feb2012), documento WO 2012/118972	Proceso de precipitación (lote 120210), WO 2012/118972	Proceso de precipitación (lote 130117)	Proceso de intercambio de disolventes (lote 121026 IPA2)	Proceso de intercambio de disolventes (lote 121026 B)
Tamaño del lote	1110-2580 g	1142 g	1110 g	0,5 g	10 g	200 g	50 g	930 g
Acetamida	88-453 ppm	350 ppm	356 ppm	<28 ppm		<47 ppm	35 ppm	<18 ppm
TFA	<0,04-0,25 %	0,2 %	0,14 %		0,09 %	0,10 %	<0,04 %	<0,04 %
Acetato	0,6-4,7 %	<0,6 %	0,6 %			<0,01 %	0,08 %	0,21 %
Amonio	0,02-1,94 %	1,05 %	1,58 %	0,23 %		0,61 %	0,17 %	0,11 %
Producto de degradación (RRT 1,33)	<0,10-0,15 %	<0,10 %	0,10 %		0,31 %	0,89 %	0,10 %	0,11 %
Pureza cromatográfica por UPLC		97,3 %	97,6 %			97,0 %	97,8 %	97,1 %
Impurezas totales	2,24 % (n = 7) 1,46-2,71 %	2,33 %	1,87 %		2,51 %	2,89 %	2,17 %	2,92 %
ROS (disolvente orgánico residual)	ACN 0-40 ppm	Todos <20 ppm	ACN 40 ppm	Acetato de etilo 20 ppm	IPA 90 000 ppm	IPA 1700 ppm	ACN 240 ppm	IPA 320 ppm
				IPA 27 000 ppm				
				Metanol 250 ppm				
				MTBE 20 ppm Tetrahidrofurano 70 ppm				
Densidad aparente	0,03-0,06 g/cc	0,033 g/cc			0,486 g/cc	0,64 g/cc	0,03 g/cc	0,056 g/cc
Tamaño de partícula de dispersante de aire (D50 um.)	182-234	235				300	635	91

(continuación)

	Proceso de liofilización de ACN (promedio o intervalo)	Proceso de liofilización de ACN (lote 101221), documento WO 2012/118972	Proceso de liofilización de ACN (lote 110425), documento WO 2012/118972	Proceso de precipitación (lote Feb2012), documento WO 2012/118972	Proceso de precipitación (lote 120210), WO 2012/118972	Proceso de precipitación (lote 130117)	Proceso de intercambio de disolventes (lote 121026 IPA2)	Proceso de intercambio de disolventes (lote 121026 B)
Tamaño de partícula de dispersante líquido (µm)		D10: 8 D50: 22 D90: 37	D10: 7 D50: 21 D90: 59				D10: 8 D50: 21 D90: 40	D10: 4 D50: 17 D90: 34
Rayos X	Amorfo					Amorfo	Amorfo	Amorfo
Análisis de tamiz (porcentaje retenido)		600 µm 3,6 % 425 µm 13,3 % 250 µm 8,7 % 150 µm 26,0 % 106 µm 33,2 %			600 µm 7,1 % 425 µm 2,7 % 250 µm 10,5 % 150 µm 32,7 % 106 µm 19,2 %	600 µm 11,0 % 425 µm 13,1 % 250 µm 24,7 % 150 µm 23,7 % 106 µm 11,0 %	600 µm 42,1 % 425 µm 26,3 % 250 µm 21,1 % 150 µm 7,9 % 106 µm 2,6 %	600 µm 3,6 % 425 µm 7,1 % 250 µm 17,9 % 150 µm 10,7 % 106 µm 25 %
Agua		5,4 %	7,3 %			4,9 %	5,3 %	2,7 %

Tabla XXI. Estabilidad del lote 121026B del fármaco plecanatida almacenado a 25 °C

Lote N.º: 121026B	Recipiente: Frascos transparentes de 60 ml		
Prueba	T = 0	3 meses	6 meses
Aspecto (visual)	Polvo de color blanco	Polvo de color blanco	Polvo de color blanco
Identidad UPLC I	Conforme	Conforme	Conforme
Pureza cromatográfica de plecanatida (UPLC) (% de área)	97,1 %	97,0 %	96,4 %
Impurezas totales	2,92 %	2,90 %	3,61 %
Contenido de agua (KF)	2,7 %	8,7 %	8,3 %

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para purificar un péptido sintético que comprende la secuencia agonista de guanilato ciclasa C seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-54 y 56-251, comprendiendo el proceso:

proporcionar una primera solución peptídica que comprende un péptido que comprende la secuencia agonista de guanilato ciclasa C seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-54 y 56-251, agua y acetonitrilo; cargar una columna adsorbente polimérica o RP-HPLC C₁₈ con la primera solución peptídica para adsorber el péptido en la columna adsorbente polimérica o RP-HPLC C₁₈, eluir el péptido de la columna adsorbente polimérica o RP-HPLC C₁₈ con una solución de isopropanol/agua para formar una segunda solución peptídica, someter la segunda solución peptídica a evaporación rotatoria para eliminar el exceso de isopropanol, liofilizar la segunda solución peptídica de manera que se obtenga un péptido seco, reconstituir el péptido seco en un tampón que contiene acetato de amonio para formar una tercera solución peptídica, y liofilizar la tercera solución peptídica de manera que se obtenga un péptido seco purificado.

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde el contenido de isopropanol en la solución acuosa de alcohol es de aproximadamente el 40 %.

3. El proceso de la reivindicación 1, en donde la primera solución peptídica comprende además acetamida, o en donde la primera solución peptídica comprende además ácido acético al 0,2 % o fosfato de trietilamina al 1 %.

4. El proceso de la reivindicación 1, en donde el alcohol en la segunda solución peptídica se reduce a menos del 5 %.

5. Un péptido sintético purificado, que comprende una secuencia agonista de guanilato ciclasa C seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 9 y 104, en donde el péptido purificado tiene las siguientes características:

- a) tiene una densidad aparente no superior a 0,1 g/ml;
- b) contiene menos de 50 ppm de acetamida;
- c) menos del 0,3 % de alfa-Asp-9-plecanatida (RRT 1,33); y
- d) menos del 0,05 % de ácido trifluoroacético (TFA).

6. El péptido purificado de la reivindicación 5, en donde el péptido es estable a 25 °C durante al menos tres meses.

7. El péptido purificado de la reivindicación 5, en donde el péptido tiene una distribución del tamaño de partícula caracterizada por:

- a) un valor D10 de entre aproximadamente 2-15 µm;
- b) un valor D50 de entre aproximadamente 15-50 µm; y
- c) un valor D90 de entre aproximadamente 40-80 µm

cuando se mide por dispersión de luz con dispersante líquido.

8. El péptido purificado de la reivindicación 5, en donde el péptido tiene una densidad aparente no superior a 0,06 g/ml, no superior a 0,05 g/ml o no superior a 0,04 g/ml.

9. El péptido purificado de la reivindicación 5 o 6, en donde el péptido tiene una pureza cromatográfica no inferior al 95 %, no inferior al 96 % o no inferior al 97 %.

10. El péptido purificado de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en donde el péptido está sustancialmente libre de agua, opcionalmente en donde el agua no es superior al 10 %, no superior al 9 %, no superior al 8 %, no superior al 7 %, no superior al 6 % o no superior al 5 %.

11. El péptido purificado de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en donde el péptido además está sustancialmente libre de una o más impurezas seleccionadas de acetonitrilo, alcoholes, amonio y acetato.

12. El péptido purificado de la reivindicación 11, en donde el péptido contiene menos de:

- (i) 300 ppm de acetonitrilo;
- (ii) menos de 1000 ppm de isopropanol; opcionalmente menos de 600 ppm de isopropanol; y/o
- (iii) menos del 0,25 % de acetato.

13. El péptido purificado de una cualquiera de las reivindicaciones 5-12, en donde el péptido además está sustancialmente libre de topoisómeros y/o en donde el péptido además está sustancialmente libre de iso-Asp2-plecanatida (RRT 0,96-0,97).

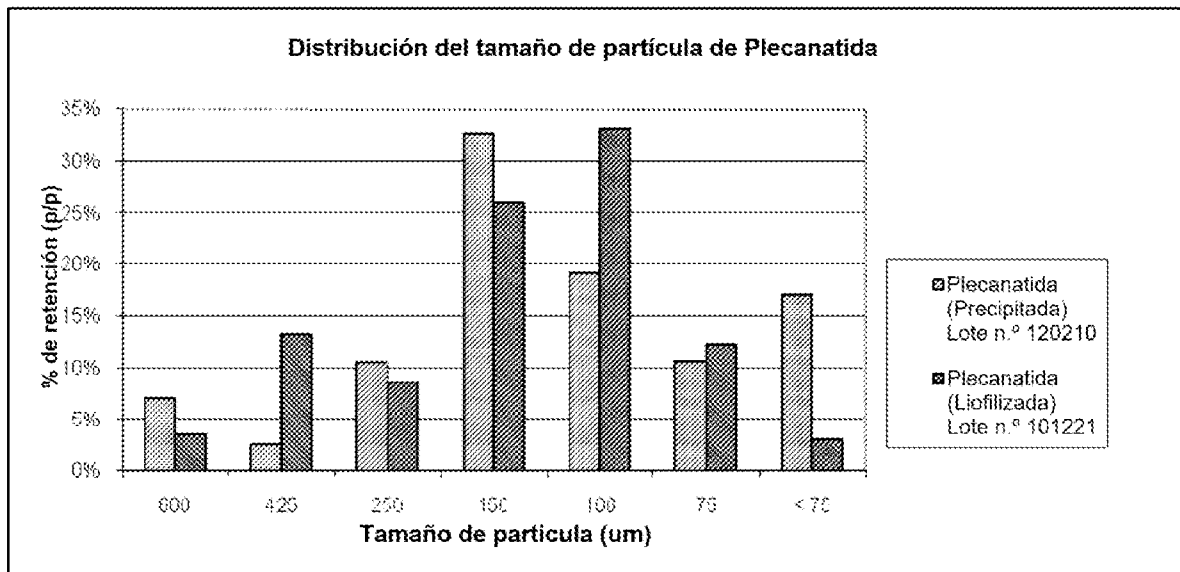


Figura 1

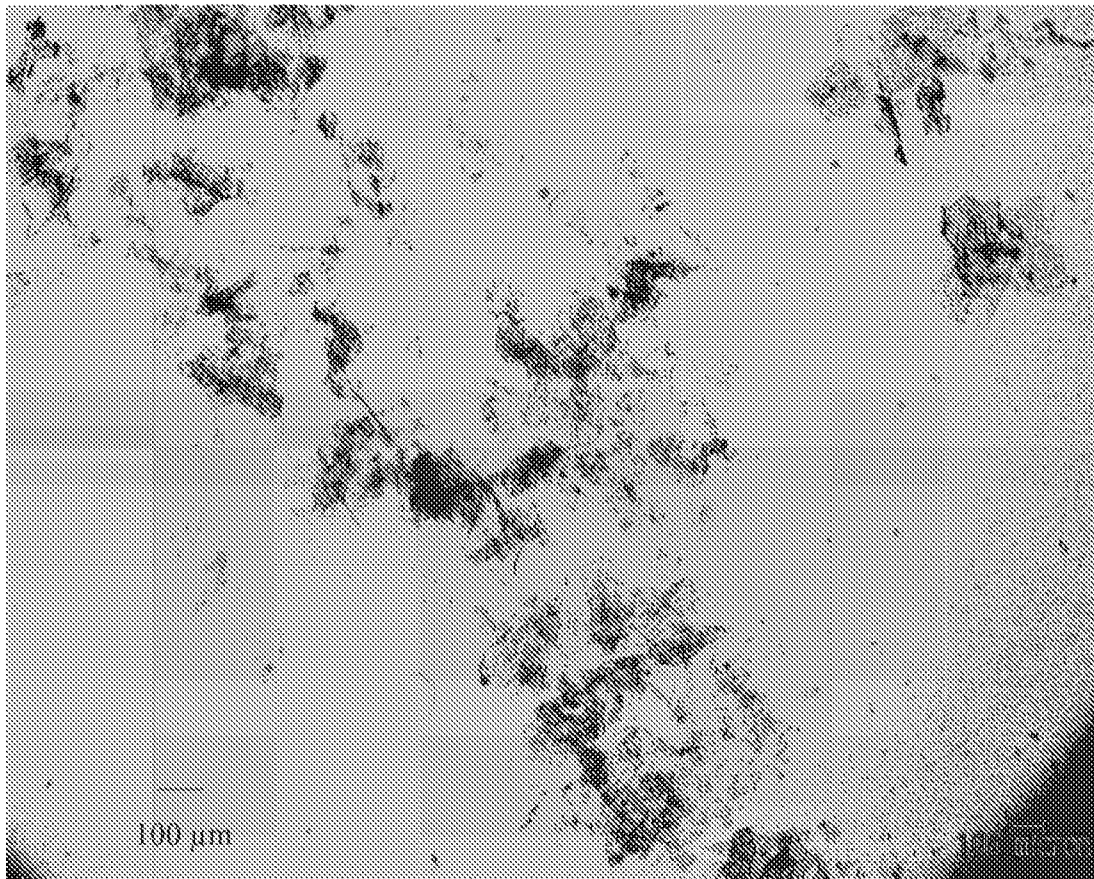


Figura 2

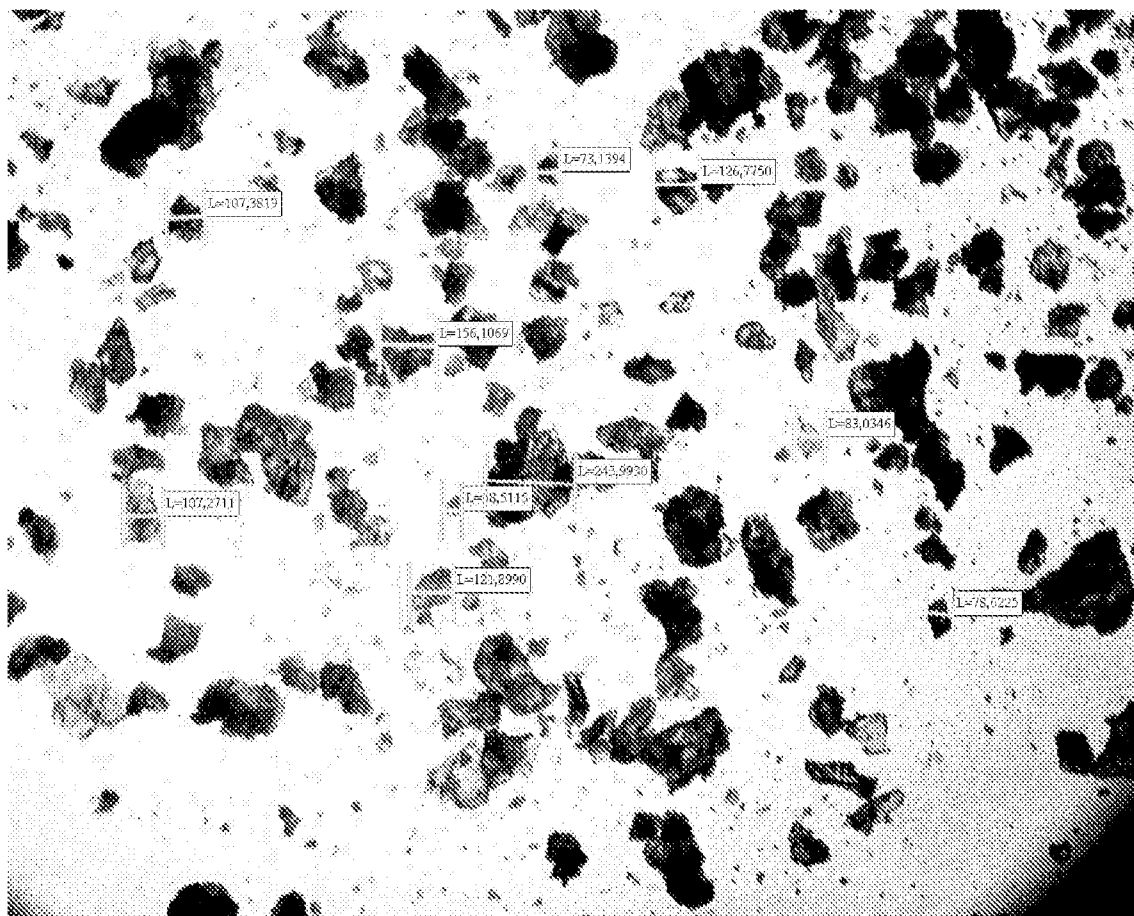
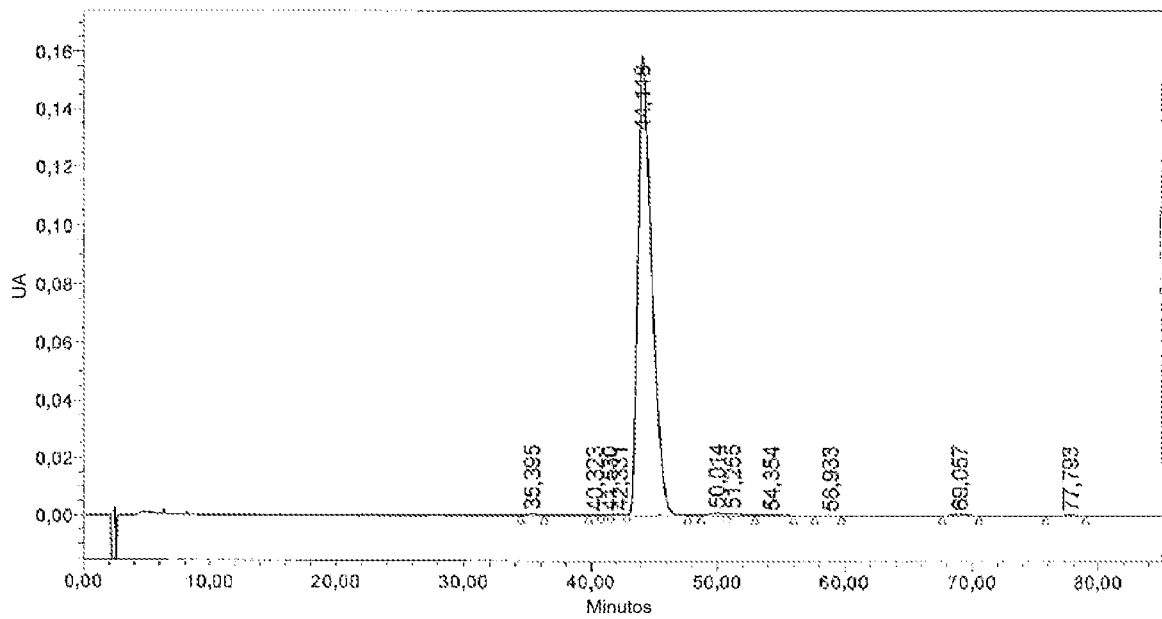


Figura 3



	TR	Área	% de área	Altura
1	35,395	25544	0,21	570
2	40,323	4201	0,03	122
3	41,530	6027	0,05	166
4	42,331	17626	0,14	323
5	44,118	12069650	97,95	158103
6	50,014	64915	0,53	903
7	51,255	49338	0,40	714
8	54,354	18505	0,15	227

9	58,933	5886	0,05	101
10	69,057	45061	0,37	565
11	77,793	15160	0,12	183

Figura 4