



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 123**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)	C07K 14/245 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)	A61P 1/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)	A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)	A61P 29/00 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)	A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07011869 .0**

96 Fecha de presentación : **28.01.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1911763**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54

Título: **Composiciones para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.**

30

Prioridad: **28.01.2003 US 443098 P**
15.05.2003 US 471288 P
12.11.2003 US 519460 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.01.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.01.2011

73

Titular/es: **IRONWOOD PHARMACEUTICALS, Inc.**
301 Binney Street
Cambridge, Massachusetts 02142, US

72

Inventor/es: **Currie, Mark G.;**
Mahajan-Miklos, Shalina;
Milne, G. Todd y
Norman, Thea

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 350 123 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:

CAMPO TÉCNICO

5 La presente exposición se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de varios trastornos, incluyendo los trastornos gastrointestinales, la insuficiencia cardiaca congestiva y la hiperplasia prostática benigna.

ANTECEDENTES

10 El síndrome del intestino irritable (IBS) es un trastorno crónico frecuente del intestino que afecta de 20 a 60 millones de personas solo en los Estados Unidos (Lehman Brothers, Global Healthcare-Irritable bowel syndrome industry update, Septiembre de 1999). El IBS es el trastorno más frecuente diagnosticado por los gastroenterólogos (28% de pacientes examinados) y totaliza el 12% de las visitas a los médicos de primeros auxilios (Camilleri 2001, *Gastroenterology* 120:652-668). En los Estados Unidos, el impacto económico del IBS se estima en 25 miles de millones de dólares al año, por los costes directos de la utilización de la atención sanitaria y los costes indirectos del absentismo en el trabajo (Talley 1995, *Gastroenterology* 109:1736-1741). Los pacientes con IBS tienen tres veces más absentismo laboral y presentan una calidad de vida reducida. Los pacientes pueden ser incapaces o estar poco dispuestos a asistir a acontecimientos sociales, al mantenimiento del empleo o a viajar incluso trayectos cortos (Drossman 1993, *Dig. Dis. Sci.* 38:1569-1580). Existe una tremenda necesidad sanitaria inadecuada en esta población ya que existen pocas opciones de prescripción para tratar el IBS.

20 Los pacientes con IBS padecen dolor abdominal y un tipo de intestino alterado. Se han definido tres subgrupos de pacientes de IBS basándose en el hábito predominante del intestino: estreñimiento predominante (c-IBS), diarrea predominante (d-IBS) o alternancia entre los dos (a-IBS). Las estimaciones de individuos que padecen de c-IBS oscilan entre el 20 y el 50% de los pacientes de IBS con 30% citado frecuentemente. En cambio los otros dos subgrupos que presentan una relación de género similar, c-IBS es más frecuente en mujeres (proporción de 3:1) (Talley *et al.* 1995, *Am. J. Epidemiol.* 142:76-83).

35 La definición y criterios de diagnóstico para IBS se han formalizado en los “criterios de Roma” (Drossman *et al.* 1999, *Gut* 45:supl. II: 1-81), que son muy aceptados en la práctica clínica. Sin embargo, la complejidad de los síntomas no ha sido explicada por anomalías anatómicas o cambios metabólicos. Esto ha conducido a la clasificación del IBS como un trastorno GI funcional, que se diagnostica basándose en los criterios de Roma y la evaluación limitada para excluir la enfermedad orgánica (Ringel *et al.* 2001, *Annu. Rev. Med.* 52:319-338). IBS se considera que es un trastorno “biopsicosocial” que procede de una combinación de tres mecanismos de interacción: motilidad alterada del intestino, un aumento de sensibilidad del intestino o colon a los estímulos del dolor (sensibilidad visceral) y factores psicosociales (Camilleri 2001, *Gastroenterology* 120:652-668). Recientemente, han aumentado las pruebas de la función de la inflamación en la etiología del IBS. Los informes indican que los subconjuntos de pacientes de IBS presentan pequeños pero significativos aumentos en la inflamación del colon y mastocitos, aumento del óxido nítrico (NO) inducible y sintasa (iNOS) y expresión alterada de las citocinas inflamatorias (estudiadas por Talley 2000, *Medscape Coverage of DDW week*).

SUMARIO

5

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

(a) un polipéptido seleccionado de entre:

10

(i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr

15

(ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr; y

(iii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

20

Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;

(b) un agente seleccionado de entre:

25

(i) un inhibidor de bomba de protones;

(ii) un agonista del receptor de H₂;

(iii) un antagonista del receptor de opioides; y

(iv) un agonista del receptor de opioides; y

30

(c) un portador farmacéuticamente aceptable.

Otros aspectos y formas de realización de la invención, que comprenden los procedimientos para la producción de los polipéptidos mencionados anteriormente, se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

35

Más generalmente, la presente exposición presenta las composiciones y los procedimientos relacionados para el tratamiento del IBS y otros trastornos y afecciones gastrointestinales, por ejemplo, unos trastornos de motilidad gastrointestinal, trastornos gastrointestinales funcionales, enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad intestinal inflamatoria, pirosis funcional, dispepsia (que incluye la dispepsia funcional o la dispepsia no ulcerosa), gastroparesia, pseudo-obstrucción intestinal crónica (o pseudo-obstrucción del colon) y trastornos y afecciones asociados al estreñimiento, por ejemplo, estreñimiento asociado a la utilización de opioides destructores del dolor, estreñimiento posquirúrgico y estreñimiento asociado a trastornos neuropáticos así como otras afecciones y trastornos. Las composiciones presentan péptidos que activan el receptor de la guanilato ciclasa C (GC-C).

45

La presente exposición presenta asimismo las composiciones y los procedimientos relacionados para el tratamiento de la obesidad, la insuficiencia cardiaca congestiva y la hiperplasia benigna de próstata (BPH).

50

Sin vincularse a ninguna teoría en particular, en el caso del IBS y otros trastornos gastrointestinales los péptidos resultan útiles debido a que pueden incrementar la motilidad gastrointestinal.

5 Sin vincularse a ninguna teoría en particular, en el caso del IBS y otros trastornos gastrointestinales los péptidos resultan útiles, en parte, debido a que pueden disminuir la inflamación.

10 Sin vincularse a ninguna teoría en particular, en el caso del IBS y otros trastornos gastrointestinales los péptidos resultan asimismo útiles debido a que pueden disminuir el dolor gastrointestinal o el dolor visceral.

15 La presente exposición presenta composiciones farmacéuticas que comprenden determinados péptidos que pueden activar el receptor de la guanilato ciclasa C (GC-C). En la exposición están comprendidas las composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido de la exposición así como composiciones de combinación que comprenden un péptido de la exposición y un segundo agente terapéutico, por ejemplo un agente para tratar el estreñimiento (por ejemplo SPI-0211; Sucampo Pharmaceuticals, Inc.; Bethesda, MD) o algún otro trastorno gastrointestinal. Ejemplos del segundo agente terapéutico incluyen: los
20 agentes reductores ácidos tales como los inhibidores de la bomba de protones y los bloqueadores del receptor H₂, los agentes de pro-motilidad tales como los agonistas del receptor 5HT (por ejemplo Zelnorm[®]), agentes antiinflamatorios, agentes antiespasmódicos, antidepresivos, agentes analgésicos que actúan centralmente tales como los agonistas de receptores opioides, los antagonistas de receptores opioides, los agentes para el tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa (por
25 ejemplo, Traficet-EN[™] (ChemoCentryx, Inc.; San Carlos, CA)), agentes que tratan el dolor gastrointestinal o visceral e inhibidores de cGMP fosfodiesterasa (motapizona, zaprinast y suldinac sulfona). Así, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden incluir un agente analgésico seleccionado de entre el grupo constituido por: bloqueadores del canal del Ca (por ejemplo, ziconotida), antagonistas del receptor 5HT (por ejemplo, antagonistas del receptor 5HT₃, 5HT₄ y 5HT₁), antagonistas del receptor opioide (por ejemplo, loperamida, fedotozina, fentanilo, naloxona, naltrexona, metil naloxona, nalmeveno, cipridima, beta funaltrexamina, naloxonazina, naltrindol, norbinaltorfimina, morfina, difeniloxilato, pentapéptido de encefalina y trimebutina), antagonistas del receptor NK₁ (por
30 ejemplo, ezlopitant y SR-14033), agonistas del receptor CCK (por ejemplo, loxiglumida), antagonistas del receptor NK₁, antagonistas del receptor NK₃ (por ejemplo, talnetant, osanetant (SR-142801)), inhibidores de la reabsorción de norepinefrina-serotonina (NSRI; por ejemplo, milnaciprán), antagonistas del receptor vanilloide y canabinoide (por ejemplo, arvanilo), sialorfina, péptidos relacionados con sialorfina que comprenden la secuencia de aminoácidos QHNPR (SEC. ID. n^o: 111) por ejemplo, VQHNPR (SEC. ID. n^o: 112); VRQHNPR (SEC. ID. n^o: 113); VRGQHNPR (SEC. ID. n^o: 114); VRGPQHNPR (SEC. ID. n^o: 115); VRGPRQHNPR (SEC. ID. n^o: 116); VRGPRRQHNPR (SEC. ID. n^o: 117); y RQHNPR (SEC. ID. n^o: 118), los compuestos o péptidos que son inhibidores de neprilisina, fraquefamida (H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH₂; documento WO 01/019849 A1), loperamida,
45 Tyr-Arg (kiotorfina), agonistas del receptor CCK (caeruleína), péptidos de conotoxina, análogos peptídicos de timulina, loxiglumida, desloxiglumida (el isómero R de loxiglumida) (documento WO 88/05774) y otros péptidos o compuestos analgésicos que pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

50 La presente exposición presenta asimismo procedimientos para el tratamiento de

diversos trastornos gastrointestinales administrando un péptido que actúa como un agonista parcial o completo del receptor de GC-C. El péptido comprende por lo menos seis cisteínas que forman tres enlaces disulfuro. En determinados casos los enlaces disulfuro se sustituyen mediante otros entrecruzamientos covalentes y en algunos casos las cisteínas se sustituyen por otros residuos para proporcionar entrecruzamientos covalentes alternativos. Los péptidos pueden incluir además por lo menos un punto de escisión de tripsina o quimiotripsina y/o un péptido o pequeña molécula analgésica con terminal carboxi, por ejemplo, AspPhe o algún otro péptido analgésico. Cuando está presente en el péptido, el péptido o las pequeñas moléculas analgésicos pueden estar precedidos por un punto de escisión de quimiotripsina o tripsina que permite la liberación del péptido o de la pequeña molécula analgésica. Los péptidos de la invención son también útiles para tratar el dolor y la inflamación asociados con varios trastornos, incluyendo los trastornos gastrointestinales. Determinados péptidos incluyen un punto de escisión funcional de quimiotripsina o tripsina situado de modo que permita la inactivación del péptido en la escisión. Determinados péptidos que tienen un punto de escisión funcional experimentan una escisión e inactivación gradual en el tubo digestivo y esto es deseable en algunas circunstancias. En determinados péptidos, un punto de quimiotripsina funcional se altera, aumentando la estabilidad del péptido *in vivo*.

La presente exposición presenta asimismo procedimientos para el tratamiento de otros trastornos tales como la insuficiencia cardiaca congestiva y la hiperplasia benigna de próstata administrando un péptido o molécula pequeña (parenteral u oralmente) que actúa como un agonista del receptor de GC-C. Dichos agentes pueden ser utilizados en combinación con péptidos natriuréticos (por ejemplo, péptidos natriuréticos auriculares, péptidos natriuréticos cerebrales o péptidos natriuréticos de tipo C), un diurético o un inhibidor de la enzima que convierte la angiotensina.

La presente exposición presenta asimismo procedimientos y composiciones para aumentar la motilidad intestinal. La movilidad intestinal implica disensiones coordinadas espontáneas y contracciones del estómago, intestinos, colon y recto para desplazar el alimento a través del tubo gastrointestinal durante el proceso digestivo.

En determinados casos los péptidos incluyen uno, dos o más aminoácidos contiguos con carga negativa (por ejemplo, Asp o Glu) o uno, dos o más restos contiguos con carga positiva (por ejemplo, Lys o Arg) o uno, dos o más aminoácidos contiguos con carga positiva o negativa en el terminal carboxi. En estos casos todos los aminoácidos contiguos en el terminal carboxi tienen carga positiva o negativa. En otros casos los aminoácidos con carga del terminal carboxi están precedidos por un Leu. Por ejemplo, las siguientes secuencias de aminoácidos pueden añadirse al terminal carboxi del péptido: Asp; Asp Lys; Lys Lys Lys Lys Lys Lys; Asp Lys Lys Lys Lys Lys Lys; Leu Lys Lys; y Leu Asp. También es posible añadir simplemente Leu al terminal carboxi.

En un primer aspecto, la presente exposición presenta un péptido que comprende, está constituido por, o está constituido esencialmente por la secuencia de aminoácidos (I): (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra. En determinados casos, Xaa₈, Xaa₉, Xaa₁₂, Xaa₁₃, Xaa₁₄, Xaa₁₇ y Xaa₁₉ pueden ser cualquier aminoácido. En determinados casos, Xaa₅ es Asn, Trp, Tyr, Asp, o Phe. En otros casos, Xaa₅ puede ser asimismo Thr o Ile. En otros casos, Xaa₅ es Tyr, Asp o Trp. En algunos casos Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro. En otros casos Xaa₈ es Glu; en

algunos casos Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; en algunos casos Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe.

5 En determinados casos, un aminoácido puede ser sustituido por un aminoácido natural, o un análogo de aminoácido natural o no natural. Por ejemplo, puede ser sustituido un aminoácido no natural mediante 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, 3-yodo-L-tirosina, triyodotironina, L-tiroxina, fenilglicina (Phg) o nortirosina (norTyr). Phg y norTyr y otros aminoácidos que comprenden Phe y Tyr pueden ser sustituidos mediante, por ejemplo, un halógeno, -CH₃, -OH, -CH₂NH₃, -C(O)H, -CH₂CH₃, -CN, -CH₂CH₂CH₃, -SH, u otro grupo.

10 En algunos casos, Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp, o Ala. En otros casos Xaa₁₂ es Asn. En algunos casos Xaa₁₃ es Ala, Pro o Gly, y en otros casos es Pro. En algunos casos Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp, y en otros casos es Ala o Gly, y todavía en otros casos es Ala. En algunos casos Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ se selecciona de entre Trp, Tyr, Phe, Asn y Leu o Xaa₁₉ se selecciona de entre Trp, Tyr, y Phe o Xaa₁₉ se selecciona de entre Leu, Ile y Val; o Xaa₁₉ es His o Xaa₁₉ se selecciona de entre Trp, Tyr, Phe, Asn, Ile, Val, His y Leu; y Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra. La presente exposición presenta asimismo procedimientos para el tratamiento de un trastorno gastrointestinal (por ejemplo, un trastorno de motilidad gastrointestinal, un trastorno gastrointestinal funcional, enfermedad de reflujo gastroesofágico, ardor estomacal funcional, dispepsia, dispepsia funcional, dispepsia no ulcerosa, gastroparesia, pseudoobstrucción intestinal crónica, o pseudoobstrucción colónica), obesidad, insuficiencia cardíaca congestiva o hiperplasia benigna de próstata mediante la administración de una composición que comprende un péptido mencionado anteriormente.

25 Cuando Xaa₉ es Trp, Tyr o Phe o cuando Xaa₁₆ es Trp el péptido presenta un sitio de escisión de quimotripsina potencialmente funcional que está dispuesto en la posición en la que la escisión inactivará la unión al receptor de GC-C por el péptido. Cuando Xaa₉ es Lys o Arg o cuando Xaa₁₆ es Lys o Arg, el péptido presenta un sitio de escisión de tripsina potencialmente funcional que está dispuesto en una posición en la que la escisión inactivará la unión al receptor de GC-C por el péptido.

30 Cuando Xaa₁₉ es Trp, Tyr o Phe, el péptido presenta un sitio de escisión de quimotripsina que está dispuesto en una posición en la que la escisión liberará la parte del terminal carboxi del péptido a Xaa₁₉. Cuando Xaa₁₉ es Leu, Ile o Val, el péptido puede presentar un sitio de escisión de quimotripsina que está dispuesto en una posición en la que la escisión liberará la parte de la terminal amino del péptido a Xaa₁₉. A un pH relativamente elevado se aprecia el mismo efecto cuando Xaa₁₉ es His. Cuando Xaa₁₉ es Lys o Arg, el péptido presenta un sitio de escisión de tripsina que está dispuesto en una posición en la que la escisión liberará la parte del terminal carboxi del péptido a Xaa₁₉. Por lo tanto, si el péptido comprende un terminal carboxi del péptido péptido analgésico a Xaa₁₉, el péptido será liberado en el tracto intestinal expuesto a la proteasa apropiada. De entre los péptidos analgésicos que pueden estar comprendidos en el péptido se encuentran: AspPhe (como Xaa₂₀Xaa₂₁), endomorfinas-1, endomorfinas-2, nocistatina, dalargina, luprón, y sustancia P y otros péptidos analgésicos descritos en la presente memoria. Estos péptidos pueden, por ejemplo, ser utilizados para sustituir Xaa₂₀Xaa₂₁.

45 Cuando Xaa₁ o el aminoácido amino terminal del péptido de la presente exposición (por ejemplo Xaa₂ o Xaa₃) es Trp, Tyr o Phe, el péptido presenta un sitio de escisión de

5 quimotripsina que está dispuesto en una posición en la que la escisión liberará la parte de la terminal amino del péptido a Xaa₁ (o Xaa₂ o Xaa₃) junto con Xaa₁, Xaa₂ o Xaa₃. Cuando Xaa₁ o el aminoácido amino terminal del péptido de la presente exposición (por ejemplo Xaa₂ o Xaa₃) es Lys o Arg, el péptido presenta un sitio de escisión de tripsina que está dispuesto en una posición en la que la escisión liberará la parte del terminal amino del péptido a Xaa₁ junto con Xaa₁, Xaa₂ o Xaa₃). Cuando Xaa₁ o el aminoácido amino terminal del péptido de la presente exposición es Leu, Ile o Val, el péptido puede presentar un sitio de escisión de quimotripsina que está dispuesto en una posición en la que la escisión liberará la parte del terminal amino del péptido a Xaa₁. A un pH relativamente elevado se aprecian los mismos efectos cuando Xaa₁ His. Por lo tanto, por ejemplo, si el péptido comprende un terminal amino del péptido analgésico a Xaa₁, el péptido el péptido será liberado en el tracto digestivo expuesto a la proteasa apropiada. De entre los péptidos analgésicos que pueden ser comprendidos en el péptidos se encuentran: AspPhe, endomorfina-1, endomorfina-2, nocistatina, dalargina, luprón, y sustancia P y otros péptidos analgésicos descritos en la presente memoria.

20 Cuando están completamente plegados, los enlaces disulfuro están presentes entre: Cys₆ y Cys₁₁; Cys₇ y Cys₁₅; y Cys₁₀ y Cys₁₈. Los péptidos de la presente exposición presentan alguna similitud de secuencia con los péptidos ST. Sin embargo, comprende los cambios de aminoácidos y/o las adiciones que mejoran la funcionalidad. Estos cambios pueden, por ejemplo, aumentar o disminuir la actividad (por ejemplo, aumentar o disminuir la capacidad del péptido para estimular la motilidad intestinal), alterar la capacidad del péptido para doblarse correctamente, la estabilidad del péptido, la capacidad del péptido para unirse al receptor de GC-C y/o disminuir la toxicidad. En algunos casos los péptidos pueden funcionar de manera más deseable que el péptido ST natural. Por ejemplo, pueden limitar los efectos secundarios no deseables tales como diarrea y deshidratación.

30 En algunos casos uno o ambos miembros de uno o más pares de restos Cys que forman normalmente un enlace disulfuro pueden ser sustituidos mediante homocisteína, 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 interiores alternativos en las posiciones de los enlaces disulfuro normales.

35 Además uno o más enlaces disulfuro pueden ser sustituidos mediante entrecruzamientos covalentes alternativos, por ejemplo, un enlace amida, una unión éster, una unión alquilo, una unión tio éster, un puente de lactamo, una unión carbamoilo, una unión de urea, una unión de tiourea, una unión de éster de fosfonato, una unión de alquilo, un éter, una unión de tioéter, o una unión amino. Por ejemplo, Ledu et al. (Proceedings Natl. Acad. Sci. 100:11263-78, 2003) describen procedimientos para la preparación de entrecruzamientos de lactamo y amida. Schafmeister et al. (J. Am. Chem. Soc. 122:5891, 2000) describen entrecruzamientos en su totalidad de carbono, estables. En algunos casos, la generación de dichos entrecruzamientos alternativos requiere sustituir los restos Cys con otros restos tales como Lys o Glu o aminoácidos no naturales.

45 En el caso de un péptido que comprenda la secuencia (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra y/o la secuencia Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra, el péptido puede todavía contener aminoácidos de terminal carboxi o terminal amino o ambos. Por ejemplo, el péptido puede comprender una secuencia de

terminal amino que facilita la producción recombinante del péptido y está escindida antes de la administración del péptido a un paciente. El péptido puede asimismo comprender otros aminoácidos de terminal amino o terminal carboxi. En algunos casos los aminoácidos adicionales protegen al péptido, estabilizan al péptido o alteran la actividad del péptido. En algunos casos algunos o la totalidad de estos aminoácidos adicionales se retiran antes de la administración del péptido a un paciente. El péptido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos en su terminal amino o terminal carboxi o ambos. No se requiere que la cantidad de aminoácidos contiguos sea la misma. Por ejemplo, pueden encontrarse 10 aminoácidos adicionales en el terminal amino del péptido y ninguno en el terminal carboxi.

En un caso de la presente exposición, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra; Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn; Xaa₁₃ es Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra. Cuando Xaa₂₀ Xaa₂₁ y/o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentran, pueden encontrarse aminoácidos contiguos adicionales en algunos casos.

Los péptidos de la presente exposición de acuerdo con la presente invención son los péptidos mencionados en las reivindicaciones adjuntas.

En un segundo aspecto, la presente exposición presenta asimismo un procedimiento profiláctico o terapéutico que comprende la administración de un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn, Trp, Tyr, Asp, Ile, Thr, o Phe; Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro; Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp o Ala; Xaa₁₃ es Pro o Gly; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe o Leu; y Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra.

En determinados casos de los procedimientos terapéuticos: el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra; Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn; Xaa₁₃ es Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, o Xaa₁₆ es cualquier aminoácido o Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp o Xaa₁₆ es cualquier aminoácido no aromático; Xaa₁₇ es Gly; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; y Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra.

En determinados casos, la presente exposición presenta un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (II):

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Asn₁₂ Pro₁₃ Ala₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Gly₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ en la que
 Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn;
 Xaa₈ es Glu, Asp;

Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Trp, Tyr o Phe;
 Xaa₁₆ es Thr, Ala, Trp;
 Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe o Leu o no se encuentra;
 y Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe.

5

En varios casos preferidos la presente exposición presenta un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (II): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Asn₁₂ Pro₁₃ Ala₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Gly₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ en la que Xaa₉ es Leu, Ile o Val y Xaa₁₆ es Trp, Tyr o Phe; Xaa₉ es Trp, Tyr o Phe; y Xaa₁₆ es Thr, Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe y Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe; y Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn; el péptido comprende menos de 50, 40, 30 o 25 aminoácidos; o menos de cinco aminoácidos anteceden a Cys₆.

10

15

20

25

30

35

40

Los péptidos de la presente exposición se pueden administrar conjuntamente o unirse, por ejemplo covalentemente a cualquier variedad de los otros péptidos que comprenden los péptidos analgésicos o los compuestos analgésicos. Por ejemplo, un péptido terapéutico de la presente exposición puede unirse a un agente analgésico seleccionado de entre el grupo constituido por: bloqueantes de canal de Ca (por ejemplo zicotonida), antagonistas del receptor de 5HT completos o parciales (por ejemplo los antagonistas de receptor de 5HT₃, 5HT₄ y 5HT₁), agonistas de receptor de 5HT completos o parciales que comprenden los agonistas de receptor de 5HT₃, 5HT₄ (por ejemplo tegaserod, mosaprida y renzaprida) y 5HT₁, agonistas de receptor de CRF (NBI-34041), agonistas de β -3 adrenerreceptor, agonistas de receptor de opioides (por ejemplo loperamida, fedotocina, fentanilo, naloxona, naltrexona, metil nalozona, nalmefeno, cipridima, beta funaltrexamina, naloxonazina, naltrindol, norbinaltofinamina, morfina, difeniloxilato, pentapéptido encefalina, asimadolina, y trimebutina), antagonistas de receptor de NK₁ (por ejemplo ezlopitant y SR-14033), agonistas de receptor de CCK (por ejemplo loxiglumida), antagonistas de receptor de NK₁, antagonistas de receptor de NK₃ (por ejemplo, talnetant, y osanetant (SR-142801)), inhibidores de la reabsorción de la norepinefrina-serotonina (NSRI; por ejemplo el milnaciprán), agonistas de receptor vaniloide y cannabinoide (por ejemplo, arvanil), sialorfina, péptidos relacionados con la sialorfina que comprenden la secuencia de aminoácidos QHNPR (SEC ID n° 111) por ejemplo VQHNPR (SEC. ID. n°: 112); VRQHNPR (SEC. ID. n°: 113); VRGQHNPR (SEC. ID. n°: 114); VRGPQHNPR (SEC. ID. n°: 115); VRGPRQHNPR (SEC. ID. n°: 116); VRGPRRQHNPR (SEC. ID. n°: 117); y RQHNPR (SEC. ID. n°: 118), compuestos o péptidos que son inhibidores de neprilisina, fraquefamida (H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH₂; WO 01/019849 A1), loperamida, Tyr-Arg (kiotorfina), agonistas del receptor CCK (caeruleína), péptidos de conotoxina, análogos peptídicos de timulina, loxiglumida, desloxiglumida (el isómero R de loxiglumida) (documento WO 88/05774) y otros péptidos o compuestos analgésicos que pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

45

50

Los espaciadores de aminoácidos, no aminoácidos, péptidos y no péptidos pueden interponerse entre un péptido que es un agonista receptor de GC-C y un péptido que presenta alguna otra función biológica, por ejemplo, un péptido analgésico o un péptido utilizado para tratar la obesidad. El enlazador puede ser el que se escinde de los péptidos contiguos *in vivo* o el que permanece unido a los péptidos contiguos *in vivo*. Por ejemplo, puede utilizarse como espaciador glicina, beta-alanina, glicil-glicina, glicil-beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, L-fenilalanina, L-triptófano y glicil-L-valil-L-fenilalanina (Chaltin *et al.* 2003 *Helvetica Chimica Acta* 86:533-547; Caliceti *et al.* 1993 *FARMCO* 48:919-32) como pueden utilizarse los polietilenglicoles (Butterworth *et al.* 1987 *J.*

5 *Med. Chem.* 30:1295-302) y derivados de maleimida (King *et al.* 2002 *Tetrahedron Lett.* 43:1987-1990). Se describen varios otros enlazadores en la bibliografía (Nestler 1996 *Molecular Diversity* 2:35-42; Finn *et al.* 1984 *Biochemistry* 23:2554-8; Cook *et al.* 1994 *Tetrahedron Lett.* 35:6777-80; Brokx *et al.* 2002 *Journal of Controlled Release* 78:115-123; Griffin *et al.* 2003 *J. Am. Chem. Soc.* 125:6517-6531; Robinson *et al.* 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5929-5934).

10 Los péptidos de la invención pueden incluir la secuencia de aminoácidos de un péptido natural en una especie de vertebrado (por ejemplo, mamífero) o en una especie bacteriana. Además, los péptidos pueden ser péptidos parcial o completamente no naturales. Asimismo están comprendidos en la presente exposición los peptidomiméticos que corresponden a los péptidos de la presente exposición. En varios casos, el paciente padece un trastorno gastrointestinal; el paciente padece un trastorno seleccionado de entre el grupo constituido por: trastorno de motilidad intestinal, síndrome del intestino irritable, estreñimiento crónico, un trastorno gastrointestinal funcional, enfermedad de reflujo gastroesofágico, ardor estomacal funcional, dispepsia, dispepsia funcional, dispepsia no ulcerosa, gastroparesia, pseudoobstrucción intestinal crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad intestinal inflamatoria, pseudoobstrucción colónica, obesidad, insuficiencia cardiaca congestiva, e hiperplasia benigna de próstata; la composición se administra oralmente; el péptido comprende 30 o menos aminoácidos, el péptido comprende 20 o menos aminoácidos, y el péptido comprende no más de 5 aminoácidos antes de Cys₆; o el péptido comprende 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 o menos aminoácidos. En otros casos, el péptido comprende 20 o menos aminoácidos. En otros casos, el péptido comprende no más de 20, 15, 10 ó 5 péptidos posteriores a Cys₁₈. En ciertos casos Xaa₁₉ es un sitio de escisión de quimotripsina o tripsina y está presente un péptido analgésico inmediatamente siguiente a Xaa₁₉.

30 En un tercer aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece estreñimiento. Los criterios aceptados clínicamente que definen la diversidad de estreñimiento oscilan desde la frecuencia de los movimientos del intestino, la consistencia de las heces y la facilidad del movimiento del intestino. Una definición habitual del estreñimiento es inferior a la de tres movimientos del intestino a la semana. Otras definiciones incluyen heces o defecación anormalmente duras que requieren esfuerzos excesivos (Schiller 2001, *Aliment Pharmacol. Ther.* 15:749-763). El estreñimiento puede ser idiopático (estreñimiento funcional o estreñimiento de tránsito lento) o secundario o de otras causas incluyendo trastornos neurológicos, metabólicos o endocrinos. Estos trastornos incluyen la diabetes mellitus, el 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 puede ser también el resultado de la cirugía (íleo posoperatorio) o debido a la utilización de fármacos tales como analgésicos (como los opioides), antihipertensores, anticonvulsionantes, antidepresivos, antiespasmódicos y antipsicóticos.

45 El procedimiento comprende la administración de una composición que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn, Trp, Tyr, Asp, Ile, Thr, o Phe; Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro; Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn,

Tyr, Asp o Ala; Xaa₁₃ es Pro o Gly; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra.

5

En un caso del procedimiento, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra; Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn; Xaa₁₃ es Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra.

10

En varios casos preferidos, el estreñimiento está asociado a la utilización de un agente terapéutico; el estreñimiento está asociado con un trastorno neuropático; el estreñimiento es el estreñimiento posquirúrgico (íleo posoperatorio); el estreñimiento está asociado a un trastorno gastrointestinal; el estreñimiento es idiopático (estreñimiento funcional o estreñimiento de tránsito lento); o el estreñimiento está asociado a un trastorno neurológico, metabólico o endocrino (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 puede ser también el resultado de la cirugía (íleo posoperatorio) o debido a la utilización de fármacos tales como analgésicos (por ejemplo, opioides), antihipertensores, anticonvulsionantes, antidepresivos, antiespasmódicos y antipsicóticos.

15

20

25

En un cuarto aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece un trastorno gastrointestinal, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn, Trp, Tyr, Asp, Ile, Thr, o Phe; Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro; Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp o Ala; Xaa₁₃ es Pro o Gly; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra.

30

35

40

En un caso del procedimiento, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra; Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn; Xaa₁₃ es Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra.

45

En varios casos, el paciente padece un trastorno gastrointestinal; o un paciente padece un trastorno seleccionado de entre el grupo constituido por: trastorno de motilidad intestinal, síndrome del intestino irritable, estreñimiento crónico, un trastorno gastrointestinal funcional, enfermedad de reflujo gastroesofágico, ardor estomacal funcional, dispepsia, dispepsia

50

funcional, dispepsia no ulcerosa, gastroparesia, pseudoobstrucción intestinal crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad intestinal inflamatoria, pseudoobstrucción colónica, obesidad, insuficiencia cardiaca congestiva, e hiperplasia benigna de próstata.

5

En varios casos preferidos, Xaa₉ es L^Nleu, Ile o Val y Xaa₁₆ es Trp, Tyr o Phe; Xaa₉ es Trp, Tyr o Phe y Xaa₁₆ es Thr o Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe; Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn.

10

En un quinto aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para aumentar la motilidad gastrointestinal en un paciente, comprendiendo el procedimiento: administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn, Trp Tyr, Asp, Ile, Thr, o Phe; Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro; Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp o Ala; Xaa₁₃ es Pro o Gly; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra.

15

20

25

En un caso el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra, Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn; Xaa₁₃ es Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra.

30

35

40

En un sexto aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para aumentar la actividad de un receptor de la guanilato ciclasa (GC-C) intestinal en un paciente, comprendiendo el procedimiento: administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn Tyr, Asp, Ile, Thr, o Phe; Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro; Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp o Ala; Xaa₁₃ es Pro o Gly; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra.

45

En un caso el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra; Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn; Xaa₁₃ es Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra.

50

En un séptimo aspecto, la presente exposición presenta una molécula de ácido nucleico

aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn, Trp, Tyr, Asp, Ile, Thr o Phe; Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro; Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp o Ala; Xaa₁₃ es Pro o Gly; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra.

En un caso el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra; Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn; Xaa₁₃ es Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra.

En un octavo aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento del estreñimiento, comprendiendo el procedimiento administrar un agonista del receptor de la guanilato ciclasa (GC-C) intestinal. En varios casos, el agonista es un péptido, comprendiendo el péptido cuatro Cys que forman dos enlaces disulfuro, y comprendiendo el péptido seis Cys que forman tres enlaces disulfuro.

En un noveno aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de un trastorno gastrointestinal, un trastorno de motilidad gastrointestinal, el síndrome del intestino irritable, el estreñimiento crónico, un trastorno gastrointestinal funcional, la enfermedad del reflujo gastroesofágico, la acidez estomacal funcional, la dispepsia, la dispepsia funcional, la dispepsia no ulcerosa, la gastroparesia, la pseudoobstrucción intestinal crónica, la pseudoobstrucción colónica, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa, la enfermedad intestinal inflamatoria, la obesidad, la insuficiencia cardíaca congestiva, o la hiperplasia benigna de próstata, comprendiendo el procedimiento administrar un agonista del receptor de la guanilato ciclasa (GC-C) intestinal bien oralmente, por supositorio rectal, o parenteralmente. En varios casos, el agonista es un péptido, comprendiendo el péptido cuatro Cys que forman dos enlaces disulfuro, y comprendiendo el péptido seis Cys que forman tres enlaces disulfuro.

En un décimo aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de un trastorno gastrointestinal seleccionado de entre el grupo constituido por: un trastorno de motilidad intestinal, síndrome del intestino irritable, estreñimiento crónico, un trastorno gastrointestinal funcional, enfermedad de reflujo gastroesofágico, acidez estomacal funcional, dispepsia, dispepsia funcional, dispepsia no ulcerosa, gastroparesia, pseudoobstrucción intestinal crónica, pseudoobstrucción colónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enfermedad intestinal inflamatoria, comprendiendo el procedimiento administrar un agonista del receptor de la guanilato ciclasa (GC-C) intestinal. En varios casos la composición se administra oralmente; el péptido comprende 30 o menos aminoácidos, el péptido comprende 20 o menos aminoácidos, o el péptido comprende no más de 5 aminoácidos antes de Cys₅.

En varios casos, el agonista es un péptido, comprendiendo el péptido cuatro Cys que

forman dos enlaces disulfuro, o comprendiendo el péptido seis Cys que forman tres enlaces disulfuro.

5 En un undécimo aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de la obesidad, comprendiendo el procedimiento administrar un agonista del receptor de la guanilato ciclasa (GC-C) intestinal. En varios casos, el agonista es un péptido, comprendiendo el péptido cuatro Cys que forman dos enlaces disulfuro, o comprendiendo los péptidos seis Cys que forman tres enlaces disulfuro.

10 En un duodécimo aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de la obesidad, comprendiendo el procedimiento administrar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn, Trp, Tyr, Asp, Ile, Thr, o Phe; Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro; Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp o Ala; Xaa₁₃ es Pro o Gly; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ Trp, Tyr, Phe o Leu; y Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra. El péptido se puede administrar solo o en combinación con otro agente para el tratamiento de la obesidad, por ejemplo, la sibutramina u otro agente, por ejemplo, un agente descrito en la presente memoria.

25 En un caso el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra; Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp o Phe; Xaa₁₂ es Asn; Xaa₁₃ Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; y Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra.

30 En un decimotercer aspecto, la presente exposición presenta una composición farmacéutica que comprende un polipéptido descrito en la presente memoria.

35 En un decimocuarto aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva, comprendiendo el procedimiento: administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn, Trp, Tyr, Asp, Ile, Thr, o Phe; Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro; Xaa₉ Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp o Ala; Xaa₁₃ es Pro o Gly; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe o Leu; y Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra. El péptido se puede administrar en combinación con otro agente para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva, por ejemplo un péptido natriurético (tal como el péptido natriurético atrial, el péptido natriurético cerebral o el péptido natriurético de tipo C), un diurético, o un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina.

50 En un caso el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄

Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra; Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn,; Xaa₁₃ es Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp; Xaa₁₇ es Gly,; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra.

5

En un decimoquinto aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata, comprendiendo el procedimiento: administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra y Xaa₅ es Asn, Trp, Tyr, Asp, Ile, Thr, o Phe; Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro; Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp o Ala; Xaa₁₃ es Pro o Gly; Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, Trp,; Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala; Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe o Leu; Xaa₁₉ es Lys o Arg; Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra.

10

15

20

El péptido puede ser administrado en combinación con otro agente para el tratamiento de la BHP, por ejemplo, un inhibidor de la 5-alfa reductasa (por ejemplo, la finasterida) o un inhibidor alfa adrenérgico (por ejemplo, la doxazosina).

25

En un caso el péptido comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra; Xaa₈ es Glu; Xaa₉ es Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe; Xaa₁₂ es Asn; Xaa₁₃ es Pro; Xaa₁₄ es Ala; Xaa₁₆ es Thr, Ala, Lys, Arg, Trp,; Xaa₁₇ es Gly; Xaa₁₉ es Tyr o Leu; y Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra.

30

En un decimosexto aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento o la reducción del dolor, que comprende el dolor visceral, dolor asociado a un trastorno gastrointestinal o dolor asociado a algún otro trastorno, comprendiendo el procedimiento: administrar a un paciente una composición que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, por ejemplo, un polipéptido purificado que comprende una secuencia de aminoácidos dada a conocer en la presente memoria.

35

40

En un decimoséptimo aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de la inflamación, que comprende la inflamación del tracto gastrointestinal, por ejemplo, inflamación asociada a un trastorno o infección gastrointestinal o algún otro trastorno, comprendiendo el procedimiento: administrar a un paciente una composición que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, por ejemplo un polipéptido purificado que comprende una secuencia de aminoácidos dada a conocer en la presente memoria.

45

50

En determinados casos el péptido incluye un péptido que comprende o está constituido por la secuencia de aminoácidos Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys Cys Glu Xaa₉ Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Xaa₂₀ Xaa₂₁ (SEC. ID. nº: 66), en la que Xaa₉ es cualquier

aminoácido, en la que Xaa₉ es cualquier aminoácido diferente a Leu, en la que Xaa₉ se selecciona de entre Phe, Trp y Tyr; en la que Xaa₉ se selecciona de entre cualquier otro aminoácido aromático natural o no natural, en la que Xaa₉ es Tyr; en la que Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr; en la que Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄ y Xaa₅ no se encuentran; en la que Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄ no se encuentran; en la que Xaa₁, Xaa₂ y Xaa₃ no se encuentran; en la que Xaa₁ y Xaa₂ no se encuentran; en la que Xaa₁ no se encuentra; en la que Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o no se encuentra o Xaa₂₀ es Asn o Glu y Xaa₂₁ no se encuentra o Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentran. En el caso de un péptido que comprende la secuencia (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ no se encuentra y/o la secuencia Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁ no se encuentra el péptido puede todavía contener aminoácidos carboxi terminales o amino terminales o ambos.

Entre los péptidos útiles están los péptidos que comprenden, están constituidos o están esencialmente constituidos por la secuencia de aminoácidos Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys Cys Glu Xaa₉ Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Xaa₂₀ Xaa₂₁ (II) (SEC. ID. nº: 66), son los péptidos siguientes:

Gln Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: -67)
 20 Asn Thr Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 68)
 Asn Leu Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 69)
 Asn Ile Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 70)
 Asn Ser Ser Gln Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 71)
 25 Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 72) Gln Ser
 Ser Gln Tyr
 Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 73)
 Ser Ser Gln Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 74). Asn Ser
 Ser Asn Tyr
 Cys Cys Glu Ala Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 75)
 30 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 76)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Asn Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 77)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Asp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 78)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Cys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 79)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Gln Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 80)
 35 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Glu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 81)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Gly Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 82)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu His Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 83)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 84)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 85)
 40 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Met Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 86)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 87)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Pro Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 88)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Ser Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 89)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Thr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 90)
 45 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 91)
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 92)
 Cys Cys Glu Ala Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 93)
 Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 94)
 Cys Cys Glu Asn Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 95)
 50 Cys Cys Glu Asp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 96)
 Cys Cys Glu Cys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 97)
 Cys Cys Glu Gln Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 98)
 Cys Cys Glu Glu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 99)

Cys Cys Glu Gly Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 100)
 Cys Cys Glu His Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 101)
 Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 102)
 5 Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 103)
 Cys Cys Glu Met Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 104)
 Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 105)
 Cys Cys Glu Pro Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 106)
 Cys Cys Glu Ser Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 107)
 10 Cys Cys Glu Thr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 108)
 Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 109)
 Cys Cys Glu Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 110)

15 En un decimooctavo aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva, comprendiendo el procedimiento administrar un agonista parcial o completo del receptor de la guanilato ciclasa (GC-C) intestinal. El agonista puede ser administrado en combinación con otro agente para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva, por ejemplo, un péptido natriurético tal como el péptido natriurético atrial, el péptido natriurético cerebral o el péptido natriurético de tipo C), un diurético, o un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina.

20 En un decimonoveno aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de la BHP, comprendiendo el procedimiento administrar un agonista completo o parcial del receptor de la guanilato ciclasa (GC-C) intestinal. El agonista puede ser administrado en combinación con otro agente para el tratamiento de BHP, por ejemplo, un inhibidor de la 5-alfa reductasa (por ejemplo, la finasterida) o un inhibidor alfa adrenérgico (por ejemplo, la doxazosina).

30 En un vigesimoprimer aspecto, la presente exposición presenta un procedimiento para el tratamiento de la obesidad, comprendiendo el procedimiento administrar un agonista parcial o completo del receptor de la guanilato ciclasa (GC-C) intestinal. El agonista puede administrarse en combinación con otro agente para el tratamiento de la obesidad, por ejemplo, el fragmento del péptido YY₃₋₃₆ de la hormona intestinal (PYY₃₋₃₆) (*N. Engl. J. Med.* 349:941, 2003; ikpeapge daspeelnry yaslrhynl vtrqry) glp-1 (péptido-1 similar al glucagón), exendina-4 (inhibidor de glp-1), sibutramina, fentermina, fendimetrazina, hidrocloreuro de bencfetamina (Didrex), orlistat (Xenical), hidrocloreuro de dietilpropión (Tenuato), fluoxetina (Prozac), bupropión, efedra, cromo, *garcinia cambogia*, benzocaína, sargazo vejigoso (*focus vesiculosus*), quitosán, nomame herba, galega (Goat's Rue, lila francesa), ácido linoleico conjugado, L-carnitina, fibra (faragatona, fibra guar), cafeína, deshidroepiandrosterona, camedrio (*teucrium chamaedrys*), B-hidroxi- β -metilbutirato y piruvato. Puede administrarse tal como por terapia conjunta un péptido útil para tratar la obesidad con un péptido de la presente exposición como molécula distinta o como parte de una proteína de fusión con un péptido de la presente exposición. Así, por ejemplo, PYY₃₋₃₆ puede fusionarse con el terminal carboxi o amino de un péptido de la presente exposición. Dicha proteína de fusión puede incluir un punto de escisión de quimiotripsina o tripsina que puede permitir la escisión para separar los dos péptidos.

50 Los péptidos y agonistas del receptor de la guanilato ciclasa (GC-R) intestinal pueden utilizarse para tratar el estreñimiento o la motilidad intestinal reducida, la digestión lenta o el ayuno gástrico lento. Pueden utilizarse péptidos para aliviar uno o más síntomas del IBS (hinchazón, dolor, estreñimiento), GERD (reflujo ácido en el esófago), dispepsia funcional o gastroparesia (náuseas, vómitos, hinchazón, ayuno gástrico retardado) y otros trastornos

descritos en esta memoria.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se describen en la descripción adjunta.

5

FIGURAS

La Figura 1a representa los resultados del análisis por LCMS del péptido MD-915 y el péptido MM-416776 recombinantes.

10

Las Figuras 1b y c representan los resultados del análisis por LCMS del péptido sintético MD-1100 y el blanco.

La Figura 2 representa los resultados del ensayo de actividad del receptor GC-C intestinal del péptido MM-416776, MD-915 sintéticos y dos péptidos MD-1100 diferentes.

15

La Figura 3a representa el efecto del péptido recombinante MM-416776 y de Zelnorm[®] en un modelo de tránsito gastrointestinal murino.

20

La Figura 3b representa el efecto del péptido MM-416776 sintético y de Zelnorm[®] en un modelo de tránsito gastrointestinal murino.

La Figura 3b representa el efecto del péptido sintético MD-1100 y de Zelnorm[®] en un modelo de tránsito gastrointestinal murino crónico.

25

Las Figuras 4a y 4b representa el efecto de los péptidos MD-915, MD-1100, y MM-416776 en un modelo de tránsito gastrointestinal murino agudo.

La Figura 4c representa el efecto del péptido MD-1100 en un modelo de tránsito gastrointestinal murino crónico.

30

La Figura 5a representa el efecto del péptido MM-416776 y de Zelnorm[®] en un modelo de secreción intestinal de ratón lactante.

35

La Figura 5b representa el efecto de MD-1100 y de Zelnorm[®] en un modelo de secreción intestinal de ratón.

Las Figuras 6a y 6b representa los efectos de los péptidos MM416776, MD-1100 y MD-915 en un modelo de secreción intestinal de ratón.

40

La Figura 7 presenta los resultados de un experimento en el que se analizó la actividad de MD-1100 en el modelo de dilatación de colon TNBS.

Las Figuras 8a y 8b presentan los efectos de diferentes dosis de MD-915 y MD-1100 en el ensayo de retorcimiento de dolor PBQ.

45

La Figura 9 presenta los resultados del análisis de determinación de Kd utilizando MD-1100 en un ensayo de unión competitiva de radioligando.

50

Las Figuras 10a y 10b presentan los datos de biodisponibilidad para IV y MD-1100

administrado por vía oral y detectado por un ensayo ELISA y LCMS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Los péptidos de la presente exposición que comprenden los péptidos según la
invención, se unen al receptor de guanilato ciclase intestinal (GC-C), un regulador clave de
balance de fluido y electrolitos en el intestino. Cuando se estimula, este receptor, que está
situado en la membrana apical de la superficie del epitelio intestinal, produce un aumento en
10 GPM cíclico (GMPc) del epitelio intestinal. Este aumento de GPMc se cree que produce una
disminución de agua y de absorción de sodio y un aumento de cloruro y de secreción de ión
potasio, que conduce a cambios en el fluido intestinal y en el transporte de electrolitos y a un
aumento de la motilidad intestinal. El receptor de GC-C intestinal posee una zona de unión
al ligando extracelular, una zona transmembranaria, una zona similar a la proteína cinasa
15 intracelular y un dominio catalítico de ciclase. Las funciones propuestas para el receptor de
GC-C son de homeostasis de fluido y de electrolito, la regulación de la proliferación celular
epitelial y la producción de apoptosis (Shalubhai 2002 *Curr. Opin. Drug Dis. Devel.* 5:261-
268).

20 Además de ser expresada en el intestino por las células epiteliales gastrointestinales,
GC-C se expresa en los tejidos extraintestinales incluyendo el riñón, pulmones, páncreas,
pituitaria, cápsulas suprarrenales, hígado en desarrollo (estudiado en Vaandrager 2002, *Mol.*
Cell. Biochem. 230:73-83) y los tejidos genitales masculino y femenino (estudiados en
Vaandrager 2002, *Mol. Cell. Biochem.* 230:73-83)). Esto sugiere que los agonistas del
receptor de GC-C pueden utilizarse en el tratamiento de trastornos fuera del tubo digestivo,
25 por ejemplo, la insuficiencia cardíaca congestiva y la hiperplasia prostática benigna.

La ghrelin, una hormona peptídica segregada por el estómago, es un regulador clave
del apetito en los seres humanos. Los niveles de expresión de ghrelin están regulados por el
ayuno y el vacío gástrico (Kim *et al.*, 2003, *Neuroreprt.* 14:1317-20; Gualillo *et al.*, 2003,
30 *FEBS Letts* 552: 105-9). De este modo, al aumentar la motilidad gastrointestinal, los
agonistas del receptor de GC-C pueden también utilizarse para regular la obesidad.

En los seres humanos, el receptor de GC-C es activado por la guanilina (Gn)
(patente U.S. nº 5.96.097), uroguanilina (Ugn) (patente U.S. nº 5.140.102) y linfoguanilina
(Forte *et al.*, 1999, *Endocrinology* 140:1800-1806). Resulta interesante que estos agentes
35 son de 10 a 100 veces menos potentes que una clase de péptidos derivados de bacterias,
denominados ST (estudiados en Gianella 1995 *J. Lab. Clin. Med.* 125:173-181). Los
péptidos ST se consideran superagonistas de GC-C y son muy resistentes a la degradación
proteolítica.

40 El péptido ST es capaz de estimular el sistema nervioso entérico (Rolfe *et al.*, 1994,
J. Physiol. 475: 531-537; Rolfe *et al.*, 1999, *Gut* 44: 615-619; Nzegwu *et al.*, 1996, *Exp.*
Physiol. 81: 313-315). Asimismo, se ha descrito que GMPc tiene efectos antinocirreceptores
en muchos modelos animales del dolor (Lázaro Ibáñez *et al.*, 2001, *Eur. J. Pharmacol.* 426:
45 39-44; Soares *et al.*, 2001, *British J. Pharmacol.* 134: 127-131; Jain *et al.*, 2001, *Brain Res.*
909:170-178; Amarante *et al.*, 2002, *Eur. J. Pharmacol.* 454:19-23). De este modo, los
agonistas de GC-C pueden tener tanto un efecto analgésico así como un efecto
antiinflamatorio.

50 En las bacterias, los péptidos ST proceden de una preproteína que generalmente

tiene por lo menos 70 aminoácidos. Las pre y pro zonas se escinden como parte del proceso de secreción y la proteína madura resultante, que generalmente incluye menos de 20 aminoácidos, es biológicamente activa.

5 Entre los péptidos ST bacterianos conocidos están: ST Ib de *E. coli* (Moseley *et al.* (1983) *Infect. Immun.* 39:1167) que tiene la secuencia madura de aminoácidos Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC. ID. nº: 1); ST Ia de *E. coli* (So y McCarthy (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4011) que tiene la secuencia de aminoácidos madura Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr (SEC. ID. nº: 2); ST I* de *E. coli* (Chan y Giannella (1981) *J. Biol. Chem.* 256:7744) que tiene la secuencia de aminoácidos madura Asn Thr Phe Tyr Cys Gys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys Asn (SEC. ID. nº: 3); el péptido ST de *C. freundii* (Guarino *et al.* (1989) *Infect. Immun.* 57:649) que tiene la secuencia madura de aminoácidos Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr (SEC. ID. nº: 4); los péptidos ST de *Y. enterocolitica*, Y-ST(Y-STa), Y-STb e Y-STc (estudiados en Huang *et al.* (1997) *Microb. Pathog.* 22:89) que tiene las siguientes preformas de secuencias de aminoácidos: Gln Ala Cys Asp Pro Pro Ser Pro Pro Ala Glu Val Ser Ser Asp Trp Asp Cys Cys Asp Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys (SEC. ID. nº: 5) (así como una variante Ser-7 a Leu-7 de Y-STa (SEC. ID. nº: 124), (Takao *et al.* (1985) *Eur. J. Biochem.* 152:199); Lys Ala Cys Asp Thr Gln Thr Pro Ser Pro Ser Glu Glu Asn Asp Asp Trp Cys Cys Glu Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys (SEC. ID. nº: 6); Gln Glu Thr Ala Ser Gly Gln Val Gly Asp Val Ser Ser Ser Thr Ile Ala Thr Glu Val Ser Glu Ala Glu Cys Gly Thr Gln Ser Ala Thr Thr Gln Gly Glu Asn Asp Trp Asp Trp Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Phe Gly Cys (SEC. ID. nº: 7), respectivamente; el péptido ST de *Y. kristensenii* que tiene la secuencia de aminoácidos madura Ser Asp Trp Cys Cys Glu Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys (SEC. ID. nº: 8); el péptido ST no 01 de *V. cholerae* (Takao *et al.* (1985) *FEBS Lett.* 193:250) que tiene la secuencia de aminoácidos madura Ile Asp Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Phe Gly Cys Leu Asn (SEC. ID. nº: 9); y el péptido ST de *V. mimicus* (Arita (1991) *et al. FEMS Microbiol. Lett.* 79:105) que tiene la secuencia de aminoácidos madura Ile Asp Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Phe Gly Cys Leu Asn (SEC. ID. nº: 10). La tabla a continuación proporciona las secuencias de todos o una parte de numerosos péptidos ST maduros.

Número de registro del GenBank®	GI de GenBank®	Secuencia
QHECIB	69638	NSSNYCCELCCNPACTGCY (SEC ID nº:1)
P01559	123711	NTFYCCELCCNPACAGCY (SEC ID nº:2)
AAA24653	147878	NTFYCCELCCNPACAPCY (SEC ID nº:11)
P01560	123707	NTFYCCELCCYPACAGCN (SEC ID nº:3)
AAA27561	295439	IDCCEICCNPAFCGCLN (SEC ID nº:9)
P04429	123712	IDCCEICCNPAFCGCLN (SEC ID nº:10)
S34671	421286	IDCCEICCNPAFCF (SEC ID nº:12)
CAA52209	395161	IDCCEICCNPAFCG (SEC ID nº:13)
A54534	628844	IDCCEICCNPAFCGCLN (SEC ID nº:14)
AAL02159	15592919	IDRCEICCNPAFCGCLN (SEC ID nº:15)
AAA18472	487395	DWDCCDVCCNPACAGC (SEC ID nº:16)
S25659	282047	DWDCCDVCCNPACAC (SEC ID nº:17)
P74977	3913874	NDDWCCEVCCNPACAGC (SEC ID nº:18)
BAA23656	2662339	WDWCCELCCNPACFCG (SEC ID nº:19)
P31518	399947	SDWCCEVCCNPACAGC (SEC ID nº:8)

La forma inmadura (incluyendo las pre y pro zonas) de la proteína ST-1A (ST-P) de *E. coli* tiene la secuencia siguiente:

5 mkkllmlaifisvlfsfqsqstesldsskekitletkkcdvkvknnsekkksenmnnfyccelccnpacagcy (SEC. ID. n°: 20; véase número de registro de GenBank® n° P01559 (gi:123711)). La presecuencia se extiende desde los aa 1 a 19. La prosecuencia se extiende desde los aa 20 al 54. La proteína madura se extiende desde el 55 al 72. La forma inmadura (incluyendo las pre y pro zonas) de la proteína ST-1B (ST-H) de *E. coli* tiene la secuencia siguiente:

10 mkksilfilfsvlfsfpfaqdakpvesskekitleskkcniaakksnksqpesmnsnyccelccnpactgcy (SEC. ID. n°: 21; véase el n° de registro del GenBank® P07965 (gi:3915589)). La forma inmadura (incluyendo las pre y pro zonas) de la proteína ST de *Y. enterocolitica* tiene la secuencia siguiente:

15 mkkivfvlvmlssfgafgqetvsgqfsdalstpitaevyqacdpplppaevssdwccdvccnpacage (SEC. ID. n°: 22; véase el n° de registro del GenBank® S25659 (gi:282047)).

20 Los péptidos de la presente exposición, que comprende los péptidos según la invención, como los péptidos ST bacterianos, tienen seis restos de Cys. Estos seis restos de Cys forman tres enlaces disulfuros en la forma madura y activa del péptido. Si los seis restos de Cys están identificados, desde el terminal amino al carboxi del péptido, como A, B, C, D, E, y F, entonces los enlaces disulfuro forman los siguientes: A-D, B-E y C-F. La formación de estos enlaces se cree que es importante para la unión del receptor GC-C. Determinados péptidos de la presente exposición incluyen un punto de escisión de quimiotripsina potencialmente funcional, es decir, un Trp, Tyr o Phe situado entre Cys B y Cys D o entre Cys B y Cys D o entre Cys E y Cys F. La escisión en un punto de escisión de quimiotripsina reduce o elimina la capacidad del péptido para unirse al receptor de GC-C.

30 En el cuerpo humano una forma inactiva de quimiotripsina, el quimiotripsinógeno se produce en el páncreas. Cuando esta enzima llega al intestino delgado se convierte en quimiotripsina activa mediante la escisión de dos dipéptidos. La quimiotripsina activa puede escindir potencialmente péptidos en el enlace peptídico en el lado de Trp, Tyr o Phe del terminal carboxi. La presencia de quimiotripsina activa en el tubo intestinal puede conducir potencialmente a la escisión de determinados péptidos de la invención que tienen un punto de escisión de quimiotripsina funcional apropiadamente situado. Es de esperar que la escisión de la quimiotripsina modere la acción de un péptido de la invención que tiene un punto de escisión de quimiotripsina situado de forma apropiada como el péptido que atraviesa el tubo intestinal.

40 El tripsinógeno, como la quimiotripsina, es una serina proteasa que se produce en el páncreas y está presente en el tubo digestivo. La forma activa, tripsina, escindirá los péptidos que tienen un Lys o Arg. La presencia de la tripsina activa en el tubo intestinal puede conducir potencialmente a la escisión de determinados péptidos de la presente exposición que tienen un punto de escisión de quimiotripsina funcional apropiadamente situado. Es de esperar que la escisión de la quimiotripsina modere la acción de un péptido de la exposición que tiene un punto de escisión de quimiotripsina situado de forma apropiada como el péptido que atraviesa el tubo intestinal.

50 Muchos trastornos gastrointestinales, incluyendo el IBS, están asociados al dolor

abdominal o visceral. Determinados péptidos de la presente exposición incluyen etiquetas analgésicas o antinorreceptivas tales como la secuencia AspPhe del terminal carboxi inmediatamente después de un Trp, Tyr o Phe que crea un punto de escisión de quimiotripsina funcional o después de Lys o Arg que crea un punto de escisión de tripsina funcional. La quimiotripsina en el tubo intestinal puede escindir potencialmente dichos péptidos del terminal carboxi inmediatamente al resto Trp, Phe o Tyr, liberando el dipéptido, AspPhe. Este dipéptido se ha demostrado que presenta actividad analgésica en modelos animales (Abdikkahi *et al.* 2001, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 15:117-23; Nikfar *et al.* 1997, 29:583-6; Edmundson *et al.* 1998, *Clin. Pharmacol. Ther.* 63:580-93). De esta manera dichos péptidos pueden tratar tanto el dolor como la inflamación. Otros péptidos analgésicos pueden estar presentes en el terminal carboxi del péptido (después de un punto de escisión funcional) incluyendo: endomorfina-1, endomorfina-2, nocistatina, dalargina, luprón y la sustancia P. Varios de los péptidos útiles están basados en la secuencia nuclear: Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº 29). Para crear una variante que presente un sitio de escisión de quimiotripsina potencialmente funcional que pueda inactivar el péptido, tanto Leu (subrayado) como Thr (subrayado) pueden ser sustituidos por Trp, Phe o Tyr o Leu y Thr pueden ser sustituidos por (independientemente) Trp, Phe o Tyr. Para crear una secuencia que presente un dipéptido analgésico, la secuencia nuclear es seguida por AspPhe. El terminal carboxi Tyr en la secuencia de núcleo puede permitir que el dipéptido AspPhe pueda ser liberado mediante quimiotripsina en el tracto digestivo. La secuencia nuclear puede estar precedida opcionalmente por Asn Ser Ser Asn Tyr (SEC ID nº 123) o Asn.

Para crear una variante que tenga un dipéptido analgésico, la secuencia nuclear es seguida de Asp Phe. El Tyr del terminal carboxi en la secuencia nuclear puede dejar que el dipéptido Asp Phe sea liberado por la quimiotripsina en el tubo digestivo. La secuencia nuclear puede opcionalmente estar precedida por Asn Ser Ser Asn Tyr o Asn.

De este modo, las variantes útiles basadas en la secuencia nuclear incluyen:

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 26; MM-416776)

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr (SEC ID nº: -27)

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: -28; MD-915)

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 29; MM416774)

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 30-)

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 31; MD-1100)

Asn Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 32) Asn Cys Cys Glu Leu Cys Cys

Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 33)

Asn Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: -34)

Asn Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 35)

Asn Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: -36)

Asn Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 37)

Asn Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC ID nº: 38)

**Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
Phe**

(SEC ID n°: 39)

**Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr Asp
Phe**

5 (SEC ID n°: 40)

**Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
Phe**

(SEC ID n°: 41)

**Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
Phe**

10 (SEC ID n°: 42)

**Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
Phe**

15 (SEC ID n°: 43)

**Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
Phe**

(SEC ID n°: 44)

**Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
Phe**

20 (SEC ID n°: 45)

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 46)

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 47)

25 Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 48)

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 49)

Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 50)

Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 51)

Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 52)

30 Asn Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 53)

Asn Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 54)

Asn Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 55)

Asn Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 56)

Asn Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 57)

Asn Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 58)

35 Asn Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe (SEC ID n°: 59)

En algunos casos, los péptidos de la presente exposición se producen como una preproteína que incluye la secuencia principal aminoterminal:

5 mkksilfiflsvlsfspaqaqdpvesskekiteskkcniakksnksqpesmn (SEC. ID. nº: 23). Cuando el péptido es producido por una célula bacteriana, por ejemplo, *E. coli*, la secuencia principal anterior se escindiría y el péptido maduro se segregará de manera eficiente en la célula bacteriana. La patente U.S. nº 5.395.490 describe vectores, sistemas de expresión y procedimientos para la producción eficaz de péptidos ST en células bacterianas y procedimientos para conseguir la secreción eficaz de péptidos ST maduros. Los vectores, sistemas de expresión y procedimientos descritos en la patente U.S. nº 5.395.490 pueden utilizarse para producir los péptidos ST y los péptidos ST variantes de la presente exposición.

15 Péptidos variantes

La presente exposición comprende además péptidos variantes que pueden comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez (en algunas circunstancias inferiores a 5 o inferiores a 3 ó 2 o inferiores) sustituciones de aminoácidos en comparación con los péptidos específicos dados a conocer en la presente memoria. La(s) sustitución(ones) pueden ser conservadoras o no conservadoras. Los aminoácidos naturales pueden ser sustituidos por D-isómeros de cualquier aminoácido, aminoácidos no naturales, y otros grupos. Una sustitución de aminoácido conservadora provoca la alteración de un aminoácido para un aminoácido de actuación similar, o aminoácido de similar carga, polaridad o hidrofobicidad. En algunas posiciones, incluso las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden reducir la actividad del péptido. De entre las sustituciones de aminoácidos naturales, las consideradas generalmente conservadoras son:

	Para aminoácido	Código	Sustitución con cualquiera de
30	Alanina	Ala	Gly, Cys, Ser
	Arginina	Arg	Lys, His
	Asparagina	Asn	Asp, Glu, Gln
	Ácido aspártico	Asp	Asn, Glu, Gln
	Cisteína	Cys	Met, Thr, Ser
	Glutamina	Gln	Asn, Glu, Asp
35	Ácido glutámico	Glu	Asp, Asn, Gln
	Glicina	Gly	Ala
	Histidina	His	Lys, Arg
	Isoleucina	Ile	Val, Leu, Met
	Leucina	Leu	Val, Ile, Met
40	Lisina	Lys	Arg, His
	Metionina	Met	Ile, Leu, Val
	Fenilalanina	Phe	Tyr, His, Trp
	Prolina	Pro	
	Serina	Ser	Thr, Cys, Ala
45	Treonina	Thr	Ser, Met, Val
	Triptófano	Trp	Phe, Tyr
	Tirosina	Tyr	Phe, His
	Valina	Val	Leu, Ile, Met

5 En algunas circunstancias puede resultar deseable tratar a los pacientes con un péptido variante que se une al y activa el receptor de GC-C intestinal, pero es menos activo que la forma no variante del péptido. Esta actividad reducida puede surgir de la afinidad reducida para el receptor o una capacidad reducida para activar el receptor una vez unido o reducida la estabilidad del péptido. En algunos pares peptídicos de los restos Cys que forman normalmente un enlace disulfuro uno o ambos miembros del par pueden ser sustituidos por homocisteína, 3-mercaptoprolina (Kolodziej et al. 1996 Int J Pept Protein res 48:274); β , β dimetilcisteína (Hunt et al. 1993 Int Pept Protein Res 42:249) o ácido diaminopropiónico (Smith et al. 1978 J Med Chem 21:117) para formar entrecruzamientos interiores alternativos en las posiciones de los enlaces disulfuro normales.

Producción de péptidos

15 Pueden producirse péptidos útiles ya sea en bacterias que incluyen, sin limitación, *E. coli*, o en otros sistemas existentes para la producción de péptidos o proteínas (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, sistemas de expresión de baculovirus que utilizan células Sf9 de Drosophila, sistemas de expresión de levaduras o de hongos filamentosos, sistemas de expresión de células de mamíferos) o pueden sintetizarse por vía química.

20 Si el péptido o variante del péptido ha de ser producido en bacterias, por ejemplo, *E. coli*, la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido codificará también preferentemente una secuencia principal que permite la secreción del péptido maduro procedente de la célula. De este modo, la secuencia que codifica el péptido puede incluir la presecuencia y la secuencia pro, por ejemplo, de un péptido ST bacteriano natural. El péptido maduro segregado puede purificarse a partir del medio de cultivo.

30 La secuencia que codifica un péptido de la exposición, por ejemplo que codifica un péptido según la invención, se inserta preferentemente en un vector capaz de liberar y mantener la molécula de ácido nucleico en una célula bacteriana. La molécula de ADN puede insertarse en un vector que se replica de forma autónoma (los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, pGEM3Z y pcADN3 y derivados de los mismos). El ácido nucleico vector puede ser un ADN bacteriano o bacteriófago tal como un bacteriófago lambda o M13 y derivados de los mismos. La construcción de un vector que contiene un ácido nucleico descrito en la presente memoria puede seguirse por transformación de una célula huésped tal como una bacteria. Los hospedadores bacterianos adecuados incluyen pero no se limitan a, *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas* y *Salmonella*. El montaje genético incluye también, además de la molécula de ácido nucleico codificadora, elementos que permiten la expresión, tal como un activador y secuencias reguladoras. Los vectores de expresión pueden contener secuencias de control de la transcripción que controlan la iniciación de la transcripción, tales como secuencias de activador, potenciador, operador y represor. Una variedad de las secuencias de control de la transcripción son bien conocidas por los expertos en la materia. El vector de expresión puede incluir también una secuencia reguladora de la traducción (por ejemplo, una secuencia 5' no traducida, una secuencia 3' no traducida o un punto de entrada del ribosoma interno). El vector puede ser capaz de replicación autónoma o puede integrarse en el ADN hospedador para asegurar la estabilidad durante la producción del péptido.

50 La secuencia que codifica una proteína que comprende un péptido de la presente exposición, por ejemplo un péptido según la invención puede también fusionarse a un ácido

5 nucleico que codifica una etiqueta de afinidad del polipéptido, por ejemplo, glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, proteína A, etiqueta FLAG, hexa-histidina, etiqueta myc o la etiqueta HA de la gripe, para facilitar la purificación. La etiqueta de afinidad o la fusión indicadora unen el marco de lectura del péptido de interés al marco de lectura del
10 ácido nucleico que codifica la etiqueta de afinidad de modo que se genera una fusión de traducción. La expresión de la fusión produce la traducción de un solo polipéptido que incluye tanto el péptido de interés como la etiqueta de afinidad. En algunos casos cuando se utilizan etiquetas de afinidad, una secuencia de ADN que codifica un punto de reconocimiento de proteasa se fusionará entre los marcos de lectura para la etiqueta de afinidad y el péptido de interés.

15 Los montajes genéticos y los procedimientos adecuados para la producción de formas inmaduras y maduras de los péptidos y las variantes de la presente exposición, por ejemplo, de los péptidos según la invención en los sistemas de expresión de proteínas distintos de bacterias, y bien conocidos por los expertos en la materia, pueden utilizarse también para producir péptidos en un sistema biológico.

20 Pueden sintetizarse péptidos maduros y variantes de los mismos por el procedimiento en fase sólida que utiliza un sintetizador automático de péptidos. Por ejemplo, puede sintetizarse el péptido en resina de Cyc(4-CH₂Bxl)-OCH₂-4-(oximetil)-fenilacetamidometilo utilizando un programa de acoplamiento doble. Pueden utilizarse grupos protectores de forma apropiada para crear el tipo de enlace disulfuro correcto. Por ejemplo, pueden utilizarse los grupos protectores siguientes: t-butiloxicarbonilo (grupos alfa-amino); acetamidometilo (grupos tiol de restos B y E de Cys); 4-metilbencilo (grupos tiol de restos C y F de Cys); bencilo (γ-carboxilo del ácido glutámico y el grupo hidroxilo de treonina, si está presente); y bromobencilo (grupo fenólico de la tirosina, si está presente). El acoplamiento se efectúa con el anhídrido simétrico de los ácidos t-butoxicarbonilamino o éster de hidroxibenzotriazol (para los restos de asparagina o glutamina) y el péptido se desprotege y se escinde del soporte sólido en fluoruro de hidrógeno, sulfuro de dimetilo, anisol y p-tiocresol utilizando la proporción 8/1/1/0,5 (v/v/v/p) a 0°C durante 60 min. Tras la eliminación del fluoruro de hidrógeno y del sulfuro de dimetilo a presión reducida y de anisol y p-tiocresol por extracción con éter etílico y acetato de etilo sucesivamente, se extraen los péptidos en bruto con una mezcla de tampón de fosfato sódico 0,5 M, pH 8,0 y N,N-dimetilformamida utilizando la relación 1/1, v/v. El enlace disulfuro para los restos B y E de Cys es el que se forma utilizando sulfóxido de dimetilo (Tam *et al.* (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113:6657-62). El péptido resultante se purifica por cromatografía en fase inversa. El enlace disulfuro entre los restos C y F de Cys se forma en primer lugar disolviendo el péptido en ácido acético al 50% en agua. Se añade solución de yodo saturada en ácido acético glacial (1 ml de solución de yodo por 100 ml de solución). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 días en un recipiente de vidrio cerrado, se diluye la solución cinco veces con agua desionizada y se extrae con éter etílico cuatro veces para la eliminación del yoduro que no ha reaccionado. Tras la eliminación de la cantidad residual del éter etílico por evaporación rotativa la solución del producto en bruto se liofiliza y purifica por cromatografía en fase inversa sucesiva.

45 **Ensayo de unión del receptor de GC-C intestinal**

50 La capacidad de los péptidos y otros agentes para unirse al receptor de GC-C intestinal puede determinarse de la manera siguiente. Se cultivan células de la estirpe celular de carcinoma de colon humano T84 (American Type Culture Collection (Bethesda,

Md.)) hasta confluencia en placas de cultivo de 24 pocillos con una mezcla 1:1 de medio F12 de Ham y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), enriquecido con suero de ternero fetal al 5%. Las células utilizadas en el ensayo se atenúan típicamente entre 54 y 60 veces. En resumen, las monocapas de célula T84 en placas de 24 pocillos se lavan dos veces con 1 ml de tampón de unión (DMEM que contiene 0,05% de albúmina de suero bovino y HEPES 25 mM, pH 7,2), a continuación se incuban durante 30 min. a 37°C en presencia de péptidos ST de *E. coli* maduro marcado radioactivamente y el material de ensayo a varias concentraciones. Las células se lavan a continuación cuatro veces con 1 ml de DMEM y se disuelven con 0,5 ml/pocillo de NaOH 1 N. Se determina a continuación el nivel de radiactividad en el material solubilizado utilizando métodos normalizados.

Ejemplo 1: Preparación de las variantes de péptidos ST y del péptido ST natural

1a: Preparación de las variantes recombinantes de péptidos ST y del péptido ST natural

Una variante del péptido ST, al que se hace referencia como MD-915, se reprodujo de manera recombinante y se ensayó en un modelo animal. MD-915 presenta la secuencia: Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cy Tyr (SEC. ID. n°: 28). Se creó también un péptido que tiene la secuencia del péptido ST natural (MM-416776).

Los péptidos MD-915 y MM-416776 se produjeron como preproteínas utilizando los vectores producidos de la manera siguiente. Una secuencia que codifica a una pre-pro secuencia de enterotoxina estable al calor se amplió en pGK51/pGSK51 (ATCC 67728) utilizando el oligonucleótido MO3514

(5' CACACCATATGAAGAAATCAATATTATTTATTTTTCTTTCTG 3' (SEC. ID. n°: 60)) y el oligonucleótido MO3515

(5' CACACCTCGAGTTAGGTCTCCATGCTTTCAGGACCACTTTTATTAC 3' (SEC. ID. n°: 61)). El fragmento del producto de ampliación se digirió con NdeI/XhoI y se ligó con el vector de expresión T7, pET26b(+) (Novagen) se digirió con NdeI/XhoI creando de este modo el plásmido MB3976. La zona que codifica la pre-pro proteína se secuenció y se observó que codifica la secuencia de aminoácidos:

mkksilfilsvlsfspfpaqdaqpagsskekitleskkcnivkk^unk^usgpesm (SEC. ID. n°: 24) que difiere de la secuencia de aminoácidos del precursor a2 de enterotoxina estable al calor (sta2; mkksilfilsvlsfspfpaqdaqpagsskekitleskkcnivkkⁿnesspesm (SEC. ID. n°: 25); n° de registro de GenBank® n° Q47185, GI: 3913876) en tres posiciones (indicadas mediante subrayado y texto en negrita) cerca del terminal C. Para crear los vectores de expresión con la pre-pro secuencia, los oligos complementarios que codifican cada variante del péptido ST o el péptido ST natural se hibridaron y clonaron en el vector de expresión MB3976. Para crear el MB3984 (que codifica el péptido ST natural completo como prepro proteína), que contienen la secuencia de aminoácidos, NSSNYCCELCCNPACTGCY (SEC. ID. n°: 26) se fusionó corriente debajo de la pre-pro secuencia, MB 3976 se digirió con BsaI/XhoI y se ligó a los oligos MO3621 hibridados

(5'GCATGAATAGTAGCAATTACTGCTGTGAATTGTGTTGTAATCCTGCTTGTACCGGGTG CTATTAATAAC 3' (SEC. ID. n°: 62)) y MO3622

(5'TCGAGTTATTAATAGCACCCGGTACAAGCAGGATTACAACACAATTCACAGCAGTAAT
TGCTACTATTC 3' (SEC. ID. nº: 63)). Para crear el MB3985 (que codifica el péptido MD-915
como una prepro proteína) que contiene la siguiente secuencia de aminoácidos,
NSSNYCCEYCCNPACTGCY (SEC. ID. nº: 28) se fusionó corriente debajo de la pre-pro
5 secuencia, MB 3976 se digirió con Bsal/XhoI y se ligó a los oligos MO3529 hibridados

(5'GCATGAATAGTAGCAATTACTGCTGTGAATATTGTTGTAATCCTGCTTGTACCGGGTG
CTATTAATAAC 3' (SEC. ID. nº: 64)) y MO3530

(5'TCGAGTTATTAATAGCACCCGGTACAAGCAGGATTACAACAATATTCACAGCAGTAAT
TGCTACTATTC 3' (SEC. ID. nº: 65)).

El péptido MD-915 y el péptido MM-416776 se produjeron de la forma siguiente. Los
15 vectores de expresión se transformaron en el hospedador bacteriano BL21 λ DE3
(Invitrogen) de *E. coli*. se inoculó una sola colonia y se cultivó agitando durante la noche a
30°C en caldo de cultivo L + 25 mg/l de kanamicina. El cultivo de la noche se añadió a 3,2 l
del medio del lote (25 g/l de glucosa, 5 g/l de caseaminoácidos, 5 g/l de extracto de
levadura, 13,3 g/l de KH₂PO₄, 4 g/l de (NH₄)₂HPO₄, 1,2 g/l de MgSO₄·7H₂O, 1,7 g/l de ácido
cítrico, 8,4 mg/l de EDTA, 2,5 mg/l de CoCl₂·6H₂O, 15 mg/l de MnCl₂·4H₂O, 1,5 mg/l de
20 CuCl₂·4H₂O, 3 mg/l de H₃BO₃, 2,5 mg/l de Na₂MoO₄·2H₂O, 13 mg/l de acetato Zn·2H₂O, 100
mg/l de citrato férrico, 25 mg/l de kanamicina, 1 ml/l de antiespumante DF 204) y se
fermentó utilizando los siguientes parámetros de proceso: pH 6,7 – control con base
solamente (NH₄OH al 28%), 30°C, aireación: 5 litros por minuto. Tras el consumo inicial de la
glucosa del lote (basado en el control de las concentraciones de oxígeno disuelto (DO)), se
25 añadieron 1,5 l de medio de alimentación (700 g/l de glucosa, 10 g/l de caseaminoácidos, 10
g/l de extracto de levadura, 4 g/l de MgSO₄·7H₂O, 13 mg/l de EDTA, 4 mg/l de CoCl₂·6H₂O,
23,5 mg/l de MnCl₂·4H₂O, 2,5 mg/l de CuCl₂·4H₂O, 5 mg/l de H₃BO₃, 4 mg/l de
Na₂MoO₄·2H₂O, 16 mg/l de acetato Zn·2H₂O, 40 mg/l de citrato férrico, 1 ml/l de
antiespumante DF 204) a un ritmo de alimentación controlado para mantener 20% de DO.
30 Se añadió IPTG a 0,2 mM 2 horas después del comienzo de la alimentación. La duración
total de la preparación fue aproximadamente de 40 a 45 horas (hasta el final de la
alimentación).

Se recogieron las células por centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos. Se
35 descargó el sedimento celular y el sobrenadante se pasó a través de una unidad de
ultrafiltración de 50 Kd. El filtrado de 50 Kd (0,6 litros) se alimentó a una columna de flujo
rápido Q-Sepharose de 110 ml (Amersham Pharmacia, equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH
7,5) a un caudal de 400 ml/hora. Se lavó la columna con seis volúmenes de Tris-HCl 20 mM,
pH 7,5 y se eluyeron las proteínas con ácido acético 50 mM recogiendo las fracciones de 50
40 ml. Las fracciones que contienen la variante del péptido ST o el péptido ST natural se
agruparon y se eliminó el disolvente por evaporación rotativa. Las proteínas secas se
volvieron a poner en suspensión en 10 ml de ácido acético al 8%, ácido trifluoroacético al
0,1% (TFA) y se cargaron a una columna C18-A de Varian Polaris (250 × 21,2 mm 10 µm,
equilibrada en el mismo tampón) a un caudal de 20 ml/min. Se lavó la columna con 100 ml
45 de metanol al 8%, TFA al 0,1% y se desarrolló con un gradiente (300 ml) de metanol del 24
al 48%, TFA al 0,1%, recogiendo las fracciones de 5 ml. Se agruparon las fracciones que
contienen el péptido y se eliminó el disolvente por evaporación rotativa. Los péptidos se
disolvieron en TFA al 0,1% y se liofilizaron.

50 Las fracciones del péptido MD-915 y del péptido MM-416776 se analizaron por

LCMS y HPLC estándar. El análisis por LCMS puso de manifiesto que MD-915 es más homogéneo que MM-416776 (véase la Figura 1a; obsérvese que el péptido MD-915 presenta menos picos (panel B) que MM-416776 (Panel A)).

5 **1b: Preparación de la variante sintética de los péptidos ST y del péptido ST natural**

10 Los péptidos fueron sintetizados por vía química por una compañía de síntesis de péptidos comerciales. Se obtuvieron rendimientos variables de péptidos dependiendo de la eficacia de la síntesis química. De este modo, los cuatro péptidos, en orden decreciente de rendimiento fueron: Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC. ID. n^o: 31; MD-1100), 10 al 20% de rendimiento; Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC. ID. n^o: 29; MM-416776); Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC. ID. n^o: 28; MD-915); Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr (SEC. ID. n^o: 26; MM-416776), <5% de rendimiento. De este modo los cambios de aminoácido específico introducidos en las proteínas pueden crear propiedades de fabricación mejoradas.

20 La Figura 1b presenta el perfil cromatográfico iónico completo del péptido fabricado sintéticamente de MD-1100. La Figura 1c presenta el perfil cromatográfico iónico completo de la muestra del blanco de referencia. Existe un pico principal presente en la muestra del MD-1100 que no está tampoco presente en la muestra de referencia. El análisis cuantitativo sugiere que MD-1100 es de pureza >98%.

25 **Ejemplo 2: Activación del receptor GC-C intestinal por una variante del péptido ST y el péptido ST**

30 La capacidad de MD-915, MM-416776 y MD-1100 para activar el receptor de GC-C intestinal se evaluó en un ensayo empleando la estirpe celular de carcinoma de colon humano T84 (American Type Culture Collection (Bethesda, Md.)). Las células de ensayo se cultivaron hasta confluencia en placas de cultivo de 24 pocillos con una mezcla 1:1 de medio F12 de Ham y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), enriquecido con suero de ternero fetal al 5% y se utilizaron entre 54 y 60 atenuaciones.

35 En resumen, las monocapas de células T84 en placas de 24 pocillos se lavaron dos veces con 1 ml/pocillo de DMEM, a continuación se incubaron a 37°C durante 10 min. con 0,45 ml de DMEM que contenía isobutilmetilxantina (IBMX) 1 mM, un inhibidor del nucleótido cíclico fosfodiesterasa. Los péptidos de ensayo (50 µl) se añadieron a continuación y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. El medio se aspiró y la reacción se terminó a continuación mediante la adición de 0,5 ml de HCl 0,1 N enfriado en hielo. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 20 minutos y a continuación se evaporaron a sequedad utilizando un cañón térmico o centrifugación al vacío. Las muestras secas se volvieron a poner en suspensión en 0,5 ml de tampón fosfato proporcionado en el kit Cyclic GMP EIA de Cayman Chemical (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Se midió GMP cíclico por EIA según los procedimientos esbozados en el kit Cyclic GMP EIA de Cayman Chemical.

50 La Figura 2 presenta la actividad de las variantes del péptido sintetizado por vía química en este ensayo de actividad del receptor de GC-C. En este ensayo, MM-416776 y dos péptidos diferentes MD-1100, (MD-110 (a) y MD-1100 (b), sintetizados por dos procedimientos diferentes) tenían actividad comparable a la de MM-416776. Los péptidos

MD-915 y MM-416776 se sintetizaron por vía química de manera idéntica a la del MD-1100 (b).

Ejemplo 3: MD-915 y MM-416776 aumentan el tránsito intestinal en ratones

5

Con el objetivo de determinar si los péptidos aumentan la velocidad del tránsito gastrointestinal, se examinaron los péptidos y las referencias utilizando un ensayo de tránsito gastrointestinal murino (GIT) (Moon *et al. Infection and Immunity* 25:127, 1979). En este ensayo, se administra carbón activo a ratones, que puede observarse fácilmente en el tubo digestivo después de la administración de un compuesto de ensayo. Se mide la distancia recorrida por el carbón activo y se expresa como porcentaje de la longitud total del colon.

10

15

20

25

Los ratones se mantuvieron en ayunas con acceso libre al agua durante 12 a 16 horas antes del tratamiento con péptido o tampón de referencia. Los péptidos se administraron por vía oral a razón de 1 µg/kg a 1 mg/kg de péptido en el tampón (Tris 20 mM, pH 7,5) 7 minutos antes de administrar una dosis oral de carbón activado al 5% (Aldrich 242276-250G). A los ratones de referencia se les administró tampón solamente antes de administrar una dosis de carbón activado. Después de 15 minutos, se sacrificaron los ratones y se disecaron sus intestinos desde el estómago al ciego. Se midió en cada animal la longitud total del intestino así como la distancia recorrida desde el estómago al frente de carbón activo y los resultados se expresan como porcentaje de la longitud total del intestino recorrido por el frente de carbón activo. Todos los resultados se expresan como promedio de 10 ratones ± desviación estándar. Una comparación de la distancia recorrida por el carbón activo entre el ratón tratado con péptido frente al ratón tratado con vehículo solo se realizó utilizando una prueba de la t de Student y se consideró una diferencia estadísticamente significativa para $P < 0,05$. Se calcularon los valores P utilizando una prueba de la T para valores emparejados que supone varianzas desiguales.

30

35

40

Como puede apreciarse en la Figura 3a, b, el péptido ST natural MM-416776 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 0,1 mg/kg), MD-1100 fabricado sintéticamente y Zelnorm[®] (0,1 mg/kg), fármaco aprobado para el IBS que es un agonista para el receptor 5HT4 de serotonina, aumenta la velocidad del tránsito gastrointestinal en este modelo. La Figura 4a presenta el resultado de un estudio que demuestra que la velocidad de tránsito intestinal aumenta con una dosis creciente de MM-416776 o MD-915 sintetizado de manera recombinante. La Figura 4b presenta los resultados de un estudio que demuestra que ambos péptidos MM-416776 o MD-1100 sintetizados por vía química aumentan las velocidades de tránsito intestinal más que el tampón Tris solo o una dosis equivalente de Zelnorm[®].

45

50

Se realizó un experimento idéntico para determinar si MD-1100 es eficaz en un régimen de tratamiento de dosificación crónica. En resumen, a ratones hembra CD1 de 8 semanas de vida se administran dosis por vía oral una vez al día durante 5 días con MD-1100 (0,06 mg/kg o 0,25 mg/kg en Tris 20 mM, pH 7,5) o vehículo solo (Tris 20 mM, pH 7,5). El 5º día, se realiza un ensayo GIT idéntico al anterior excepto que se administran 200 µl de una solución con carbón activo al 10%. La Figura 4c presenta los resultados de un estudio que demuestra que tanto MD-1100 sintetizado por vía química como Zelnorm[®] son eficaces en un ensayo de motilidad gastrointestinal de ratón en dosificación crónica (cada día durante 5 días). Los resultados se presentan en paralelo con dosificación aguda (1 día).

Ejemplo 4: El péptido MD-915 y el péptido MM-416776 aumentan la secreción intestinal en ratones lactantes (ensayo SuMi)

5 Se examinó la capacidad del péptido MM-416776 y de MD-915 al aumentar la secreción intestinal utilizando un modelo de ratón lactante de secreción intestinal. En este modelo se administra un compuesto de ensayo a los ratones lactantes que tienen entre 7 y 9 días de vida. Una vez sacrificados los ratones, se disecciona el tubo digestivo desde el estómago al ciego ("intestinos"). El resto ("esqueleto") así como los intestinos se pesan y se calcula la relación del peso de los intestinos al del esqueleto. Si la relación es superior a 0,09, se puede sacar la conclusión de que el compuesto de ensayo aumenta la secreción intestinal. La Figura 5a presenta una curva de respuesta a la dosis para el péptido ST natural MM-416776 en este modelo. La Figura 5b presenta la curva de respuesta a la dosis para MD-1100 en este modelo. Estos datos demuestran que el péptido ST natural (adquirido en TDT, Inc. West Chester, PA) y MD-1100 aumentan la secreción intestinal. Se estudió también el efecto de Zelnorm[®]. Como puede apreciarse en la Figura 5, el Zelnorm[®] a razón de 0,2 mg/kg no aumenta la secreción intestinal en este modelo. La Figura 6a presenta una curva de respuesta a la dosis para el péptido recombinante MM-416776 descrito anteriormente y el péptido recombinante MD-915 descrito anteriormente. Como puede apreciarse en la Figura 6a, ambos péptidos aumentan la secreción intestinal en este modelo. Asimismo la Figura 6b presenta una curva de respuesta a la dosis para MD-915, MD-1100 y MM-416776 sintetizados por vía química así como el péptido ST natural (adquirido en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

25 Modelos animales de hiperalgesia de colon

La hipersensibilidad a la dilatación colorrectal es frecuente en pacientes con IBS y puede ser responsable del síntoma principal de dolor. Se han desarrollado modelos animales tanto inflamatorios como no inflamatorios de hiperalgesia visceral hasta dilatación para investigar el efecto de los compuestos sobre el dolor visceral en IBS.

I. Modelo de alodinia rectal provocada por el ácido trinitrobencensulfónico (TNBS)

35 Se medicaron previamente ratas Wistar macho (220-250 g) con 0,5 mg/kg de acepromazina inyectada por vía intraperitoneal (IP) y se anestesiaron por administración intramuscular de 100 mg/kg de ketamina. Se implantaron pares de electrodos de alambre de nicromo (60 cm de longitud y 80 µm de diámetro) en un músculo estriado del abdomen, 2 cm lateralmente de la línea blanca. Los extremos libres de los electrodos se exteriorizaron en el dorso del cuello y se protegieron mediante un tubo de plástico unido a la piel. Se iniciaron los registros electromiográficos (EMG) 5 días después de la intervención quirúrgica. La actividad eléctrica del músculo abdominal estriado se registró con un electroencefalógrafo (Mini VIII, Alvar, París, Francia) utilizando una constante de tiempo corto (0,03 s.) para eliminar las señales de baja frecuencia (<3 Hz).

45 Diez días después de la implantación quirúrgica, se administró ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) para provocar la inflamación rectal. Se administró por vía intrarrectal TNBS (80 mg kg⁻¹ en 0,3 ml de etanol al 50%) mediante un catéter de caucho de silicona introducido a 3 cm del ano bajo anestesia ligera de éter dietílico, como se describe (Morteau *et al.* 1994 *Dig. Dis. Sci.* 39:1239). Después de la administración de TNBS, se colocaron las ratas en túneles de plástico donde se les limitó severamente la movilidad

5 durante varios días antes de la dilatación colorrectal (CRD). Se administró compuesto experimental una hora antes de CRD lo que se realizó por inserción en el recto, a 1 cm del ano, de un globo de 4 cm de longitud de preservativo de látex (Gue *et al.*, 1997 *Neurogastroenterol. Motil.* 9:271). El globo se fijó sobre un catéter rígido extraído de una sonda de embolectomía (Fogarty). El catéter unido al globo se fijó a la base de la cola. El globo, conectado a un regulador barométrico, se infló progresivamente por etapas de 10 15 mm Hg, desde 0 a 60 mm Hg, durando 5 min cada etapa de inflado. La evaluación de la sensibilidad rectal, medida por EMG, se realizó antes (1 a 2 días) y 3 días después de la instilación rectal de TNBS.

El número de explosiones por púa que corresponde a las contracciones abdominales se determinó para periodos de 5 min. El análisis estadístico del número de contracciones abdominales y la evaluación de las relaciones dosis-efectos se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de (pruebas de Student o de Dunnett) post-hoc y análisis de regresión para ED50 si procede.

La Figura 7 presenta los resultados del experimento en el que se analizó la actividad del MD-1100 en el modelo colorrectal de TNBS. Se observan disminuciones significativas en la respuesta abdominal a 0,3 µg/kg y 3 µg/kg de MD-1100. Estos resultados demuestran que MD-1100 reduce el dolor asociado a la dilatación colorrectal en este modelo animal.

20 II. Modelo de hiperalgesia provocado por el estrés

Se implantan quirúrgicamente electrodos de alambre de nicromo a ratas Wistar macho (200-250 g) como en modelo TNBS. Diez días después de la implantación quirúrgica, se lleva a cabo estrés restringido parcial (PRS), como describe Williams *et al.*, durante dos horas (Williams *et al.* 1988 *Gastroenterology* 64:611). En resumen, bajo anestesia ligera por éter etílico, la parte superior del lomo, las patas delanteras superiores y el tronco torácico se envolvieron en un arnés restringido de cinta de papel para restringir, pero no impedir los movimientos del cuerpo. Los animales de referencia con falso estrés se anestesian pero no se envuelven. Treinta minutos antes del final de la sesión de PRS, se administra a los animales el compuesto de ensayo o el vehículo. Treinta minutos a una hora después de la terminación del PRS, se lleva a cabo el procedimiento de dilatación CRD como se describió anteriormente para el modelo TNBS con el regulador barométrico a las presiones de 15, 30, 45 y 60 mm Hg. Se determina el análisis estadístico sobre el número de explosiones y se analiza como en el modelo TNBS anteriormente.

35 Modelo de contorsiones provocadas por fenilbenzoquinona

40 El modelo de contorsiones provocadas por PBQ puede utilizarse para evaluar la actividad del control del dolor de los péptidos y los agonistas del receptor de GC-C de la presente exposición, por ejemplo de los péptidos según la invención. Este modelo está descrito por Siegmund *et al.* (1957 *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 95:729-731). En resumen, una hora después de la dosificación oral del compuesto del ensayo, por ejemplo, un péptido, 45 morfina o vehículo, se inyecta solución al 0,02% de fenilbenzoquinona (PBQ) (12,5 ml/kg) por vía intraperitoneal en el ratón. Se registra el número de estiramientos y contorsiones del 5º al 10º minuto después de la inyección de PBQ, y asimismo puede contarse entre el 35º y 40º minutos y entre el 60º y 65º minutos para proporcionar una evaluación cinética. Los resultados se expresan como el número de estiramientos y contorsiones (media ± SEM) y el porcentaje de variación de umbral nocirreceptor se calcula a partir del valor medio del grupo 50

tratado con el vehículo. La significación estadística de cualquier diferencia entre los grupos tratados y el grupo de referencia se determina por una prueba de Dunnett utilizando la varianza residual después de un análisis de varianza de una vía ($P < 0,05$) utilizando el programa informático SigmaStat.

5

Las Figuras 8a y 8b presentan el efecto de diferentes dosis de MD-915 y MD-1100 en el ensayo de contorsión de PBQ. Como referencia positiva en el ensayo se utilizó la indometacina, un NSAID (fármaco antiinflamatorio no esteroideo) con actividad de control del dolor conocida. Se observaron reducciones significativas en las contorsiones para MD-915 (dosis de 1 mg/kg) y MD-1100 (dosis de 2,5 mg/kg) comparados con el vehículo de referencia. Se ha observado pérdida de eficacia a la dosis mayor probada también en otros muchos compuestos (tales como los antagonistas 5HT-3) probados en ensayos similares. Los resultados de este estudio sugieren que tanto, MD-915 como MD-1100 presentan efectos antinociceptores en este modelo de dolor visceral comparable a las dosis de los productos intermedios de indometacina.

10

15

Ejemplo 5: Determinación de Kd del MD-1100

20

25

30

Para determinar la afinidad del MD-1100 a los receptores de GC-C observada en la mucosa intestinal de rata, se llevó a cabo un ensayo de fijación competitivo utilizando células epiteliales del intestino de rata. Se obtuvieron células epiteliales del intestino delgado de ratas como describe Kessler *et al.* (*J. Biol. Chem.* 245: 5281-5288 (1970)). En resumen, se sacrificaron los animales y se expusieron sus cavidades abdominales. El intestino delgado se enjuagó con 300 ml de solución salina enfriada en hielo o PBS. Se extirparon 10 cm del intestino delgado medido a 10 cm del píloro y se cortaron en segmentos de 1 pulgada. La mucosa intestinal se extruyó del intestino mediante suave presión entre una pieza de parafina y una punta de pipeta P-1000. Las células epiteliales del intestino se colocaron en 2 ml de PBS y se pipetearon arriba y abajo con una pipeta de 5 ml para preparar una suspensión de células. Se midió la concentración de proteínas en la suspensión utilizando el método de Bradford (*Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)).

35

40

45

Se llevó a cabo un ensayo de fijación competitivo basado en el método de Giannella *et al.* (*Am. J. Physiol.* 245: G492-G498) entre MM-416776 y MD-1100 marcados con [125 I]. La mezcla de ensayo contenía: 0,5 ml de DME con HEPES-KOH 20 mM, pH 7,0, 0,9 mg de la suspensión celular listada anteriormente, 21,4 fmoles de MM-416776 marcado con [125 I] (42,8 pM) y diferentes concentraciones de MD-1100 como competidor (0,01 a 1.000 nM). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, y la reacción se interrumpió aplicando la mezcla a filtros de fibra de vidrio GF/B (Whatman). Se lavaron los filtros con 5 ml de PBS enfriado en hielo y se midió la radioactividad. La Figura 9 demuestra que la Kd para MD-1100 en este ensayo es 4,5 nM. %B/B₀ es el porcentaje de la proporción de radioactividad atrapada en cada muestra (B) en comparación con la radioactividad retenida en una muestra de referencia sin competidor frío (B₀). Giannella *et al.* (*Am. J. Physiol.* 245: G492-G498) observaron que la Kd para el péptido ST natural en este mismo ensayo fue ~13 nM.

Ejemplo 6: Propiedades farmacocinéticas del MD-1100

50

Para estudiar la farmacocinética del péptido de MD-1100, se llevaron a cabo estudios de capacidad de absorción en ratones administrando dicho péptido por inyección en la vena de la cola por vía intravenosa o por vía oral por cebado a ratones CD1 de 8 semanas de

5 vida. Se recogió el suero de los animales en varios puntos de tiempo y se determinó la presencia del péptido de MD-1100 utilizando un ensayo inmunsorbente con enzima ligada competitivo (Oxoid, kit ST EIA, nº de cat. TD0700). El ensayo utilizó anticuerpos monoclonales contra el péptido ST (los anticuerpos se proporcionan en el kit Oxoid) y MD-1100 fabricado sintéticamente. La Figura 10a presenta los datos de absorción para MD-1100 administrado por vía intravenosa y oral detectado por el ensayo ELISA. MD-1100 parece que se absorbe mínimamente de manera generaliza y es <2,2% biodisponible.

10 Se llevó a cabo un estudio de biodisponibilidad similar en el que se utilizó LCMS en lugar de ELISA para detectar MD-1100 . Inicialmente, se extrajeron muestras de suero de la sangre completa de ratones expuestos y de referencia, a continuación se inyectó directamente (10 ml) en una columna de extracción en fase sólida (SPE) en línea (columna de 25 mm HLB de Waters Oasis, conexión directa de 2,0 × 15 mm) sin tratamiento adicional. Se lavó la muestra en la columna SPE con 5% de metanol, 95% de solución en H₂O (2,1 ml/min, 1,0 minuto), a continuación se alimentó a una columna analítica utilizando una válvula de corte que coloca la columna SPE en un paso de flujo invertido en la columna analítica (columna IS 5 mm MS C8 de Waters Xterra, 2,1 × 20 mm). La muestra se eluyó de la columna analítica con un gradiente en fase inversa (fase A móvil: hidróxido amónico 10 mM en dH₂O, fase móvil B: hidróxido amónico 10 mM en 80% de acetonitrilo y 20% de metanol; 20% de B durante los primeros 3 minutos subiendo a continuación hasta 95% de B durante 4 minutos y manteniéndolo durante 2 minutos, todo a un caudal de 0,4 ml/min.). A los 9,1 minutos, el gradiente vuelve a las condiciones iniciales de 20% de B durante 1 min. MD-1100 eluyó de la columna analítica a 1,45 minutos y se detectó por espectrometría de masas de triple cuadrupolo (MRM, 764 (estado de carga +2)>182 (estado de carga +1) Da; voltaje cónico = 30 V; colisión = 20 eV; resolución primaria = 2 Da en el pico básico; resolución secundaria = 2 Da en el pico básico). La respuesta del instrumento se convirtió en unidades de concentración por comparación con una curva patrón utilizando cantidades conocidas de MD-1100 sintetizado por vía química preparado e inyectado en suero de ratón utilizando el mismo procedimiento.

30 La Figura 10b presenta los datos de absorción para IV y MD-1100 administrado por vía oral, como se detectó por LCMS. En este ensayo, MD-1100 aparece asimismo absorbido mínimamente de forma generalizada y está <0,11% biodisponible.

35 Administración de péptidos y agonistas del receptor de GC-C

40 Para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, se administran los péptidos y agonistas de la presente exposición, por ejemplo los péptidos según la invención, preferentemente por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimido, gel, pasta, suspensión, líquido, polvo o en alguna otra forma. Las composiciones administradas por vía oral pueden incluir aglutinantes, agentes saborizantes y humectantes. Los péptidos y agonistas pueden administrarse conjuntamente con otros agentes utilizados para tratar trastornos gastrointestinales incluyendo pero sin limitarse a los agentes supresores ácidos tales como los agonistas del receptor 2 de histamina (H₂A) y los inhibidores de la bomba de protones (PPI). Los péptidos y agonistas pueden administrarse también mediante supositorios rectales. Para el tratamiento de los trastornos fuera del tubo digestivo tales como la insuficiencia cardiaca congestiva y la hipertrofia prostática benigna, los péptidos y agonistas se administran preferentemente por vía parenteral u oral.

Los péptidos descritos en la presente memoria pueden utilizarse solos o en combinación con otros agentes. Por ejemplo, los péptidos pueden administrarse junto con un péptido o compuesto analgésico. El péptido o compuesto analgésico puede unirse por enlace covalente a un péptido descrito en la presente memoria o puede ser un agente independiente que se administre junto con o sucesivamente un péptido descrito en la presente memoria en una terapia de combinación.

La terapia de combinación puede conseguirse administrando dos o más agentes, por ejemplo, un péptido descrito en la presente memoria y un péptido o compuesto analgésico, cada uno de los cuales se formula y administra por separado, o administrando dos o más agentes en una única formulación. Otras combinaciones están también comprendidas por la terapia de combinación. Por ejemplo, pueden formularse dos agentes conjuntamente y administrarse junto con una formulación independiente que contiene un tercer agente. Aunque los dos o más agentes en la terapia de combinación pueden administrarse 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. De este modo, pueden administrarse dos o más agentes en minutos entre sí o en 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 ó 24 horas entre sí o en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 días entre sí o en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 semanas entre sí. En algunos casos incluso son posibles intervalos mayores. Aunque en muchos casos es deseable que los dos o más agentes utilizados en una terapia de combinación estén presentes en el cuerpo del paciente a la vez, esto no necesita ser así.

La terapia de combinación puede incluir también dos o más administraciones de uno o más de los agentes utilizados en la combinación. Por ejemplo, si se utilizan el agente X y el agente Y en una combinación, se podrían administrar sucesivamente 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.

Los agentes, solos o en combinación, pueden combinarse con cualquier vehículo o medio farmacéuticamente aceptable. De este modo, pueden combinarse con materiales que no producen una reacción desfavorable, alérgica o de otro modo no deseada cuando se administran a un paciente. Los vehículos o medios utilizados pueden incluir disolventes, dispersantes, recubrimientos, agentes que favorecen la absorción, agentes de liberación controlada, etc.

Los agentes en su forma libre o como sal pueden combinarse con un polímero tal como el ácido poliláctico-glicólico (PLGA), el ácido poli-(l)-láctico-glicólico-tartárico (P(l)LGT) (documento WO 01/12233), ácido poliglicólico (patente U.S. nº 3.773.919), ácido poliláctico (patente U.S. nº 4.767.628); poli(ϵ -caprolactona) para crear una formulación de liberación lenta. Dichas formulaciones pueden utilizarse en implantes que liberan un péptido u otro agente durante un periodo de unos pocos días, unas pocas semanas o varios meses dependiendo del polímero, del tamaño de partícula del polímero y del tamaño del implante (véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 6.620.422). Otras formulaciones de liberación lenta se describen en las patentes EP 0 467 389 A2, WO 93/241150, U.S. nº 5.612.052; WO 97/40085, WO 94/155587, U.S. nº 5.672.659, U.S. nº 5.893.985, U.S. nº 5.134.122, U.S. nº 5.192.741, U.S. nº 5.192.741 y U.S. nº 5.445.832. En dichas formulaciones de liberación lenta las micropartículas de péptido se combinan con las micropartículas del polímero. Uno o más implantes de liberación lenta pueden colocarse en el intestino grueso, el intestino delgado o en ambos.

5 Los agentes pueden administrarse, por ejemplo, por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea o por otras vías. Los agentes pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimido, gel, pasta, suspensión, líquido, polvo o en alguna otra forma. Las composiciones administradas por vía oral pueden incluir aglutinantes, agentes saborizantes y humectantes. Los agentes pueden estar incluidos en dentífricos o colutorios. De este modo, las formulaciones orales pueden incluir abrasivos y agentes espumantes. Los agentes pueden también administrarse por vía transdérmica o en forma de supositorio.

10 Los agentes pueden ser un ácido o base libre, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los sólidos pueden disolverse o dispersarse inmediatamente antes de la administración o al principio. En algunas circunstancias las preparaciones incluyen un conservante para impedir la proliferación de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para inyectables pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas u orgánicas esterilizadas que incluyen, por ejemplo, agua, un alcohol, un disolvente orgánico, un aceite u otro disolvente o dispersante (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales). Los agentes farmacéuticos pueden esterilizarse por esterilización en filtro o por otros medios adecuados.

15 Las composiciones farmacéuticas adecuadas según la presente exposición, por ejemplo las composiciones farmacéuticas según la invención, generalmente incluirán una cantidad de compuesto(s) activo(s) con un diluyente o excipiente farmacéutico aceptable, tal como una solución acuosa esterilizada, para dar una gama de concentraciones finales, que depende del uso que se pretenda. Las técnicas de preparación generalmente son bien conocidas en la técnica, tal como se ejemplifica mediante Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edición, Mack Publishing Company, 1995).

20 Los agentes descritos en la presente memoria y los agentes para terapia de combinación pueden envasarse en forma de kit que incluye dosis individuales o múltiples de dos o más agentes, envasado o formulado cada uno individualmente, o dosis únicas o múltiples de dos o más agentes envasados o formulados en combinación. Por lo tanto, uno o más agentes pueden estar presentes en un primer recipiente, y el kit puede incluir opcionalmente uno o más agentes en un segundo recipiente. El recipiente o recipientes están colocados dentro de un envase, y el envase puede opcionalmente incluir la administración o las instrucciones de dosificación. Un kit puede incluir componentes adicionales tales como jeringuillas u otros medios para administrar los agentes así como diluyentes u otros medios para la formulación.

40 Agentes analgésicos

45 Los péptidos descritos en la presente memoria pueden utilizarse en terapia de combinación con un agente analgésico, por ejemplo, un compuesto analgésico o un péptido analgésico. El agente analgésico puede opcionalmente estar unido por enlace covalente a un péptido descrito en la presente memoria. Entre los agentes analgésicos útiles están: los bloqueadores del canal del Ca, los antagonistas del receptor 5HT (por ejemplo los antagonistas del receptor 5HT3, 5HT4 y 5HT1), los agonistas del receptor opioide (loperamida, fedotozina y fentanilo), los antagonistas del receptor NKK1, los agonistas del receptor CCK (por ejemplo, loxiglumida), los antagonistas del receptor NK1, antagonistas del receptor NK3, los inhibidores de reabsorción de norepinefrina-serotonina (NSRI), los

agonistas del receptor vanilloide y canabinoide, y sialorfina. Los agentes analgésicos en diversas clases se describen en la bibliografía.

5 Entre los péptidos analgésicos útiles están los péptidos relacionados con sialorfina, incluyendo los que comprenden la secuencia de aminoácidos QHNPR (SEC. ID. nº: 111),
incluyendo: VQHNPR (SEC. ID. nº: 112); VRQHNPR (SEC. ID. nº: 113); VRGQHNPR (SEC.
10 ID. nº: 114); VRGPQHNPR (SEC. ID. nº: 115); VRGPRQHNPR (SEC. ID. nº: 116);
VRGPRRQHNPR (SEC. ID. nº: 117); y RQHNPR (SEC. ID. nº: 118). Los péptidos
relacionados con sialorfina se unen a neprilisina e inhiben la descomposición de la sustancia
15 P y Met-enkefalina mediada por neprilisina. Por lo tanto, los compuestos o péptidos que son
inhibidores de la neprilisina sirven como agentes analgésicos que pueden administrarse con
los péptidos de la presente exposición en una terapia conjunta o unidos a los péptidos de la
presente exposición, por ejemplo a los péptidos según la invención, por ejemplo, mediante
un enlace covalente. La sialofina y los péptidos relacionados se describen en las patentes
U.S. nº 6.589.750; U.S. nº 20030078200 A1; y el documento WO 02/051453 A2.

20 Los antagonistas y agonistas del receptor opioide pueden administrarse con los
péptidos de la presente exposición, por ejemplo con los péptidos según la invención en una
terapia conjunta o unidos a los péptidos de la presente exposición, por ejemplo, a los
péptidos según la invención por ejemplo mediante un enlace covalente. Por ejemplo, los
antagonistas del receptor opioide tales como naloxona, naltrexona, metil-nalozona,
nalmefeno, cipridima, beta-funaltrexamina, naloxonazina, naltrindol y nor-binaltorfimina se
25 cree que sirven para el tratamiento del IBS. Puede ser útil formular antagonistas opioides de
este tipo en una formulación de liberación retardada y lenta tal como la liberación inicial del
antagonista en el intestino delgado medio a distal y/o en el colon ascendente. Dichos
antagonistas se describen en el documento WO 01/32180 A2. El pentapéptido enkefalina
(HOE825; Tyr-D-Lys-Gly-Phe-L-homoserina) es un agonista de los receptores opioides mu y
30 delta y se cree que son útiles para aumentar la motilidad intestinal (*Eur. J. Pharm.* 219:445,
1992), y este péptido puede utilizarse junto con los péptidos de la presente exposición, por
ejemplo con los péptidos según la invención. Es asimismo útil la trimebutina que se cree que
se une a los receptores opioides mu/delta/kappa y activa la liberación de motilina y modula
la liberación de gastrina, péptido intestinal vasoactivo, gastrina y glucagones. Los agonistas
del receptor kappa opioide tales como fedotozina, cetociclazocina y los compuestos
35 descritos en el documento WO 03/097051 A2 pueden utilizarse con o unirse a los péptidos
de la presente exposición, por ejemplo los péptidos según la invención. Además, pueden
utilizarse los agonistas del receptor mu opioide tales como morfina, difeniloxilato,
fraquefamida (H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH₂; documento WO 01/019849 A1) y loperamida.

40 Tyr-Arg (kiotorfina) es un dipéptido que actúa estimulando la liberación de met-
encefalinas para provocar un efecto analgésico (*J. Biol. Chem.* 262:8165, 1987). La
kiotorfina puede utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

45 Los agonistas del receptor CCK tales como caeruleína procedente de anfibios y otras
especies son analgésicos útiles que pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la
presente exposición.

50 Los péptidos de conotoxina representan una clase amplia de péptidos analgésicos
que actúan en los canales de Ca de voltaje controlado, en los receptores de NMDA o en los
receptores nicotínicos. Estos péptidos pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la
presente exposición.

Los análogos de péptidos de timulina (solicitud FR nº 2.830.451) pueden tener actividad analgésica y pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

5

Los antagonistas del receptor CCK (CCKa o CCKb) incluyendo la loxiglumida y la dexloxiglumida (isómero R de loxiglumida) (documento WO 88/05774) pueden presentar actividad analgésica y pueden utilizarse con los péptidos de la invención o unirse a los mismos.

10

Otros agentes analgésicos útiles incluyen los agonistas de 5-HT₄ tales como tegaserod/zelnorm y lirexaprida. Dichos agonistas se describen en las patentes: EP 1321142 A1, WO 03/053432A1, EP 505322 A1, EP 505322 B1, U.S. nº 5.510.353, EP 507672 A1, EP 507672 B1 y U.S. nº 5.273.983.

15

Los bloqueantes del canal del calcio tales como ziconotida y los compuestos relacionados descritos en, por ejemplo, las patentes EP 625162 B1, U.S. nº 5.364.842, U.S. nº 5.587.454, U.S. nº 5.824.645, U.S. nº 5.859.186, U.S. nº 5.994.305, U.S. nº 6.087.091, U.S. nº 6.136.786, WO 93/13128 A1, EP 1336409 A1, EP 835126 A1, EP 835126 B1, U.S. nº 5.795.864, U.S. nº 5.891.849, U.S. nº 6.054.429, documento WO 97/01351 A1, pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

20

Pueden utilizarse varios antagonistas de los receptores NK-1, NK-2 y NK-3 (para un estudio véase Giardina *et al.* 2003 *Drugs* 6:758) con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

25

Los antagonistas del receptor NK1 tales como: aprepitant (Merck & Co. Inc.), vofopitant, ezlopitant (Pfizer, Inc.), R-673 (Hoffmann-La Roche Ltd.), SR-14033 y los compuestos relacionados descritos, por ejemplo, en los documentos EP 873753 A1, U.S. nº 20010006972 A1, U.S. nº 20030109417 A1, WO 01/52844 A1, pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

30

Los antagonistas del receptor de NK-2 tales como nepadutant (Menarini Ricerche SpA), saredutant (Sanofi-Synthelabo), SR-144190 (Sanofi-Synthelabo) y UK-290795 (Pfizer Inc.) pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

35

Los antagonistas del receptor NK3 tales como osanetant (Sanofi-Synthelabo), talnetant y los compuestos relacionados descritos, por ejemplo, en los documentos WO 02/094187 A2, EP 876347 A1, WO 97/21680 A1, U.S. nº 6.277.862, WO 98/11090, WO 95/28418, WO 97/19927 y Boden *et al.* (*J. Med. Chem.* 39:1664-75, 1996) pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

40

Los inhibidores de reabsorción de norepinefrina-serotonina tales como milnacipran y los compuestos relacionados descritos en el documento WO 03/077897 A1 pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

45

Los antagonistas del receptor vainilloide tales como arvanilo y los compuestos relacionados descritos en el documento WO 01/64212 A1 pueden utilizarse con o unirse a los péptidos de la presente exposición.

50

5 Cuando el analgésico es un péptido y está unido por enlace covalente a un péptido descrito en la presente memoria el péptido resultante puede también incluir por lo menos un punto de escisión de tripsina o quimiotripsina. Cuando está presente en el péptido, el péptido analgésico puede ir precedido por (si está en el terminal carboxi) o seguido de (si está en el terminal amino) un punto de escisión de quimiotripsina o tripsina que permite la liberación del péptido analgésico.

10 Además de los péptidos relacionados con sialorfina, los péptidos analgésicos incluyen: AspPhe, endomorfina-1, endomorfina-2, nocistatina, dalargina, luprón, zicnótido y la sustancia P.

Métodos de tratamiento

15 Los péptidos de la presente exposición, por ejemplo los péptidos según la invención pueden utilizarse para el tratamiento o prevención del cáncer, tumores precancerosos o tumores metastásicos. Por ejemplo, pueden utilizarse para la prevención o el tratamiento del
 20 cáncer colorrectal con metástasis colorrectal/local, el cáncer del tubo digestivo, el cáncer pulmonar, cáncer o tumores precancerosos o tumores metastásicos de células epiteliales, pólipos, de mama, colorrectal, pulmonar, de ovario, pancreático, prostático, renal, de estómago, de vejiga, de hígado, de esófago y carcinoma testicular, carcinoma (por ejemplo, basocelular, basoescamoso, Brown-Pearce, carcinoma cananicular, tumor de Ehrlich, de células de Krebs, de células de Merkel, pulmonar micro o macrocítico, de células en grano de avena, papilar, bronquiolar, de células escamosas, de células de transición, de Walker),
 25 leucemia (por ejemplo, de linfocitos B, de linfocitos T, HTLV, linfocítica aguda o crónica, de mastocitos, mielóide), histiocitonia, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, plasmacitoma, reticuloendoteliosis, adenoma, adenocarcinoma, adenofibroma, adenolinfoma, ameloblastoma, angioqueratoma, hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, apudoma, bronquionía, síndrome carcinoide maligno,
 30 cardiopatía carcinoide, carcinosarcoma, cementoma, colangioma, colesteatoma, condrosarcoma, condroblastoma, cordoma, coristoma, craneofaringioma, crondroma, cilindroma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, cistosarconia filodes, disgeninoma, endimoma, sarcoma de Ewing, fibroma, fibrosarcoma, tumor macrocítico, ganglioneuroma, glioblastoma, glomangioma, tumor de granulocitos, ginandroblastoma,
 35 hamartoma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangioperictoma, hemangiosarcoma, hepatoma, tumor insulinoide, sarcoma de Kaposi, liomioma, liomiosarcoma, leucosarcoma, tumor de las células de Leydig, lipoma, liposarcoma, linfangioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma, meduloblastoma, meningioma, mesenquimoma, mesonefroma, mesotelioma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, mixoma, mixosarcoma, neurilenmoma, neuroma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neurofibromatosis, odontoma, osteoma, osteosarcoma, papiloma, paraganglioma, paraganglioma sin células cromafines, pinealoma, rabdomioma, rabdomiosarcoma, tumor de células de Sertoli, teratoma, tumor de las células de teca y otras enfermedades en las que las células se han vuelto displásicas, inmortalizadas o transformadas.

45 Los péptidos de la presente exposición, por ejemplo los péptidos según la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de: poliposis adenomatosa familiar (FAP) (síndrome autosómico dominante) que precede al cáncer de colon, cáncer colorrectal sin poliposis hereditario (HNPCC) y síndrome dominante autosómico heredado.
 50

5 Para el tratamiento o la prevención del cáncer, tumores precancerosos y tumores metastásicos, pueden utilizarse los péptidos en la terapia de combinación con radiación o agentes quimioterapéuticos, un inhibidor de una fosfodiesterasa dependiente de GMPc o un inhibidor selectivo de ciclooxigenasa-2 (en el documento WO 02062369 se describen numerosos inhibidores selectivos de ciclooxigenasa-2).

10 Los péptidos pueden ser para el tratamiento o la prevención de la inflamación. Por lo tanto, pueden utilizarse solos o en combinación con un inhibidor de fosfodiesterasa dependiente de GMPc o un inhibidor selectivo de ciclooxigenasa-2 para el tratamiento de: inflamación orgánica, IBD (por ejemplo, la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa), asma, nefritis, hepatitis, pancreatitis, bronquitis, fibrosis quística, enfermedades intestinales isquémicas, inflamaciones/alergias intestinales, celiacía, proctitis, gastroenteritis eosinófila, mastocitosis y otros trastornos inflamatorios.

15 Los péptidos pueden utilizarse también para tratar o prevenir trastornos relacionados con la insulina, por ejemplo: diabetes mellitus II, hiperglucemia, obesidad, trastornos asociados a alteraciones en la glucosa o al transporte de electrolitos y a la secreción de insulina en células o trastornos endocrinos. Pueden utilizarse también en el tratamiento de la resistencia a la insulina y en la disminución posquirúrgica y no posquirúrgica en la sensibilidad a la insulina.

25 Los péptidos pueden utilizarse para prevenir o tratar trastornos respiratorios, incluyendo, trastornos de inhalación, ventilación y secreción de mucosidades, hipertensión pulmonar, obstrucción crónica de vasos y vías respiratorias y obstrucciones irreversibles de vasos y bronquios.

30 Los péptidos pueden utilizarse en terapia de combinación con un inhibidor de fosfodiesterasa (ejemplos de tales inhibidores pueden encontrarse en la patente U.S. nº 6.333.354).

Los péptidos pueden utilizarse también para prevenir o tratar: retinopatía, neuropatía, angiopatía diabética y formación de edema.

35 Los péptidos pueden utilizarse también para prevenir o tratar trastornos neurológicos, por ejemplo, cefalea, ansiedad, trastornos del movimiento, agresión, psicosis, convulsiones, ataques de pánico, histeria, trastornos del sueño, depresión, trastornos esquizoafectivos, apnea del sueño, síndromes de insuficiencia de atención, pérdida de memoria y narcolepsia. Pueden utilizarse también como sedante.

40 Los péptidos y los péptidos marcados de manera detectable pueden utilizarse como marcadores para identificar, detectar, estadificar o diagnosticar enfermedades y afecciones del intestino delgado, incluyendo: enfermedad de Crohn, colitis, enfermedad intestinal inflamatoria, tumores, tumores benignos tales como tumores de estroma benignos, adenoma, angioma, pólipos adenomatosos (pedunculados y sésiles), tumores malignos, tumores carcinoides, tumores de células endocrinas, linfoma, adenocarcinoma, carcinoma del intestino superior, medio e inferior, tumor de estroma gastrointestinal (GIST), tal como liomioma, liomioma celular, liomioblastoma y liomiosarcoma, tumor del nervio autónomo gastrointestinal, síndromes de hipoabsorción, celiacías, diverticulosis, divertículo de Meckel, divertículos del colon, megacolon, enfermedad de Hirschsprung, síndrome de intestino irritable, isquemia mesentérica, colitis isquémica, cáncer colorrectal, poliposis de

colon, síndrome de pólipo, adenocarcinoma intestinal, síndrome de Liddle, miopatía de Brody, convulsiones infantiles y coreoatetosis.

5 Los péptidos pueden conjugarse con otra molécula (por ejemplo una molécula para diagnóstico o terapéutica) con células diana que llevan el receptor de GC-C, por ejemplo, lesiones de fibrosis quística y células específicas que revisten el tubo digestivo. Por lo tanto, pueden utilizarse para grupos radioactivos diana o grupos terapéuticos en el intestino para ayudar en el diagnóstico por imagen y en el diagnóstico o tratamiento de cáncer colorrectal/con metástasis o local y para administrar copias normales del gen supresor del tumor p53 al tubo intestinal.

10 Los péptidos pueden utilizarse solos o en terapia de combinación para tratar la disfunción eréctil.

15 Los péptidos pueden utilizarse solos o en terapia de combinación para tratar trastornos del oído interno, por ejemplo, para tratar la enfermedad de Meniere, incluyendo los síntomas de la enfermedad tales como el vértigo, la pérdida de audición, acúfenos, sensación de oído lleno y para mantener la homeostasis de fluido en el oído interno.

20 Los péptidos pueden utilizarse solos o en terapia de combinación para tratar trastornos asociados a la retención de líquido y de sodio, por ejemplo, enfermedades del sistema de transporte de electrolito-agua/electrolito en el riñón, intestinos y sistema urogenital, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, hipotensión, cirrosis hepática y síndrome nefrótico. Además pueden utilizarse para facilitar la diuresis o control del fluido intestinal.

25 Los péptidos pueden utilizarse solos o en terapia de combinación para tratar los trastornos asociados a la secreción de bicarbonato, por ejemplo, fibrosis quística.

30 Los péptidos pueden utilizarse solos o en terapia de combinación para tratar los trastornos asociados a la regeneración de los hepatocitos.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Microbia, Inc.
<120> Composiciones para el tratamiento de trastornos gastrointestinales

40 <130> 114-148 T1
<140> EP 07 011 869.0
<141> 2004-01-28

45 <150> US 60/471,288
<151> 2003-05-15

<150> US 60/519,460
<151> 2003-11-12

50

- <150> US 60/443,098
 <151> 2003-01-28
- 5 <160> 124
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
 <211> 19
 10 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
- <400> 1
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr
- 15 <210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
- 20 <400> 2
 Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
 1 5 10 15
 Cys Tyr
- <210> 3
 <211> 18
 25 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
- <400> 3
 Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly
 1 5 10 15
 Cys Asn
- 30 <210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Citrobacter freundii
- 35 <400> 4
 Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
 1 5 10 15
 Cys Tyr
- <210> 5
 <211> 30
 40 <212> PRT
 <213> Yersinia enterocolitica
- <400> 5

Gln Ala Cys Asp Pro Pro Ser Pro Pro Ala Glu Val Ser Ser Asp Trp
 1 5 10 15
 Asp Cys Cys Asp Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
 20 25 30

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Yersinia enterocolitica

<400> 6

Lys Ala Cys Asp Thr Gln Thr Pro Ser Pro Ser Glu Glu Asn Asp Asp
 1 5 10 15
 Trp Cys Cys Glu Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
 20 25 30

<210> 7

10 <211> 53

<212> PRT

<213> Yersinia enterocolitica

<400> 7

Gln Glu Thr Ala Ser Gly Gln Val Gly Asp Val Ser Ser Ser Thr Ile
 1 5 10 15
 Ala Thr Glu Val Ser Glu Ala Glu Cys Gly Thr Gln Ser Ala Thr Thr
 20 25 30
 Gln Gly Glu Asn Asp Trp Asp Trp Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro
 35 40 45
 Ala Cys Phe Gly Cys
 50

15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Yersinia kristensenii

<400> 8

Ser Asp Trp Cys Cys Glu Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys

1

5

10

15

25

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae

30

<400>9

Ile Asp Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Phe Gly Cys Leu
 1 5 10 15
 Asn

<210> 10

<211> 17

35 <212> PRT

<213> Vibrio mimicus

<400>10

Ile Asp Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Phe Gly Cys Leu
 1 5 10 15
 Asn

5

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Escherichia coli

10

<400>11

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Pro
 1 5 10 15
 Cys Tyr

15

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae

<400>12

Ile Asp Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Phe
 1 5 10

20

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae

25

<400>13

Ile Asp Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Phe Gly
 1 5 10

30

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Vibrio mimicus

35

<400>14

Ile Asp Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Phe Gly Cys Leu
 1 5 10 15
 Asn

40

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Vibrio mimicus

<400>15

	Ile	Asp	Arg	Cys	Glu	Ile	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Phe	Gly	Cys	Leu
	1				5					10					15	
	Asn															
	<210> 16															
	<211> 16															
5	<212> PRT															
	<213> Yersinia enterocolitica															
	<400>16															
	Asp	Trp	Asp	Cys	Cys	Asp	Val	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys
	1				5					10					15	
10	<210> 17															
	<211> 16															
	<212> PRT															
15	<213> Yersinia enterocolitica															
	<400>17															
	Asp	Trp	Asp	Cys	Cys	Asp	Val	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys
	1				5					10					15	
20	<210> 18															
	<211> 17															
	<212> PRT															
	<213> Yersinia enterocolitica															
	<400>18															
	Asn	Asp	Asp	Trp	Cys	Cys	Glu	Val	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Ala	Gly
	1				5					10					15	
25	Cys															
	<210> 19															
	<211> 16															
	<212> PRT															
30	<213> Yersinia enterocolitica															
	<400>19															
	Trp	Asp	Trp	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Phe	Gly	Cys
	1				5					10					15	
35	<210> 20															
	<211> 72															
	<212> PRT															
	<213> Escherichia coli															
40	<400>20															

Met Lys Lys Leu Met Leu Ala Ile Phe Ile Ser Val Leu Ser Phe Pro
 1 5 10 15
 Ser Phe Ser Gln Ser Thr Glu Ser Leu Asp Ser Ser Lys Glu Lys Ile
 20 25 30
 Thr Leu Glu Thr Lys Lys Cys Asp Val Val Lys Asn Asn Ser Glu Lys
 35 40 45
 Lys Ser Glu Asn Met Asn Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys
 50 55 60
 Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr
 65 70

<210> 21

<211> 72

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400>21

Met Lys Lys Ser Ile Leu Phe Ile Phe Leu Ser Val Leu Ser Phe Ser
 1 5 10 15
 Pro Phe Ala Gln Asp Ala Lys Pro Val Glu Ser Ser Lys Glu Lys Ile
 20 25 30
 Thr Leu Glu Ser Lys Lys Cys Asn Ile Ala Lys Lys Ser Asn Lys Ser
 35 40 45
 Gly Pro Glu Ser Met Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys
 50 55 60
 Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 65 70

10

<210> 22

<211> 71

<212> PRT

<213> Yersinia enterocolitica

15

<400>22

Met Lys Lys Ile Val Phe Val Leu Val Leu Met Leu Ser Ser Phe Gly
 1 5 10 15
 Ala Phe Gly Gln Glu Thr Val Ser Gly Gln Phe Ser Asp Ala Leu Ser
 20 25 30
 Thr Pro Ile Thr Ala Glu Val Tyr Lys Gln Ala Cys Asp Pro Pro Leu
 35 40 45
 Pro Pro Ala Glu Val Ser Ser Asp Trp Asp Cys Cys Asp Val Cys Cys
 50 55 60
 Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
 65 70

20

<210> 23

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia principal amino-terminal generada sintéticamente

<400>23

```

Met Lys Lys Ser Ile Leu Phe Ile Phe Leu Ser Val Leu Ser Phe Ser
 1      5      10      15
Pro Phe Ala Gln Asp Ala Lys Pro Val Glu Ser Ser Lys Glu Lys Ile
      20      25      30
Thr Leu Glu Ser Lys Lys Cys Asn Ile Ala Lys Lys Ser Asn Lys Ser
      35      40      45
Gly Pro Glu Ser Met Asn
      50
    
```

5 <210> 24
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

```

<400>24
Met Lys Lys Ser Ile Leu Phe Ile Phe Leu Ser Val Leu Ser Phe Ser
 1      5      10      15
Pro Phe Ala Gln Asp Ala Lys Pro Ala Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ile
      20      25      30
Thr Leu Glu Ser Lys Lys Cys Asn Ile Val Lys Lys Ser Asn Lys Ser
      35      40      45
Gly Pro Glu Ser Met
      50
    
```

15 <210> 25
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

```

20 <400>25
Met Lys Lys Ser Ile Leu Phe Ile Phe Leu Ser Val Leu Ser Phe Ser
 1      5      10      15
Pro Phe Ala Gln Asp Ala Lys Pro Ala Gly Ser Ser Lys Glu Lys Ile
      20      25      30
Thr Leu Glu Ser Lys Lys Cys Asn Ile Val Lys Lys Asn Asn Glu Ser
      35      40      45
Ser Pro Glu Ser Met
      50
    
```

25 <210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

```

<400>26
Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1      5      10      15
Gly Cys Tyr
    
```

- 5 <210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 10 <400>27
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr
- 15 <210> 28
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 20 <400> 28
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr
- 25 <210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 30 <400> 29
 Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10
- 35 <210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- <400> 30
 Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr
 1 5 10

5 <210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10 <400> 31
 Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

15 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <400> 32
 Asn Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10 15

25 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

30 <400> 33
 Asn Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr
 1 5 10 15

35 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 34
 Asn Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10 15

45

- 5
 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 10
 <400> 35
 Asn Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10 15
- 15
 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 20
 <400> 36
 Asn Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10 15
- 25
 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 30
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- <400> 37
 Asn Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10 15
- 35
 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- <400> 38
 Asn Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10 15
- 45
 <210> 39

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 39
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr Asp Phe
 20

10 <210> 40
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 40
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr Asp Phe
 20

20 <210> 41
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

30 <400> 41
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr Asp Phe
 20

35 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 42

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr Asp Phe
 20

<210> 43

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

10 <400> 43

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr Asp Phe
 20

<210> 44

<211> 21

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

20 <400> 44

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr Asp Phe
 20

<210> 45

25 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 45

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr Asp Phe
 20

35 <210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 46

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe
 1 5 10 15

5

<210> 47

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

15

<400> 47

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr Asp Phe
 1 5 10 15

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

25

<400> 48

Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe
 1 5 10 15

30

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 49

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe
 1 5 10 15

40

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 50

Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe
 1 5 10 15

5

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

15

<400> 51

Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe
 1 5 10 15

<210> 52

<211> 16

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

25

<400> 52

Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp Phe
 1 5 10 15

<210> 53

30

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 53

Asn Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
 1 5 10 15
 Phe

40

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 54

Asn Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Trp Gly Cys Tyr Asp
 1 5 10 15
 Phe

5

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 55

Asn Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
 1 5 10 15
 Phe

15

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 56

Asn Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
 1 5 10 15
 Phe

25

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

35

<400> 57

Asn Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
 1 5 10 15
 Phe

40

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 58

Asn Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
 1 5 10 15
 Phe

5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

15

<400> 59

Asn Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr Asp
 1 5 10 15
 Phe

<210> 60

<211> 42

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

25

<400> 60

cacacatat gaagaaatca atattatta ttttcttc tg 42

30

<210> 61

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 61

cacacctga gtaggtctc catgcttca ggaccactt tattac 46

40

<210> 69

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Oligonucleótido generado sintéticamente

	<400> 62		
	gcatgaatag tagcaattac tgctgtgaat tgtgttgtaa tcctgcttgt accgggtgct		60
	attaataac		69
5			
	<210> 63		
	<211> 69		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10			
	<220>		
	<223> Oligonucleótido generado sintéticamente		
	<400> 63		
	tcgagttatt aatagcacc ggtacaagca ggattacaac acaattcaca gcagtaattg		60
15	ctactattc		69
	<210> 64		
	<211> 69		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido generado sintéticamente		
25	<400> 64		
	gcatgaatag tagcaattac tgctgtgaat attgttgtaa tcctgcttgt accgggtgct		60
	attaataac		69
	<210> 65		
	<211> 69		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido generado sintéticamente		
35	<400> 65		
	tcgagttatt aatagcacc ggtacaagca ggattacaac aatattcaca gcagtaattg		60
	ctactattc		69
	<210> 66		
40	<211> 21		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Péptido generado sintéticamente		

5	<p><220> <221> VARIANTE <222> 1 <223> /sustituir=""</p>
10	<p><220> <221> VARIANTE <222> 1..2 <223> /sustituir=""</p>
15	<p><220> <221> VARIANTE <222> 1..3 <223> /sustituir=""</p>
20	<p><220> <221> VARIANTE <222> 1..4 <223> /sustituir=""</p>
25	<p><220> <221> VARIANTE <222> 1..5 <223> /sustituir=""</p>
30	<p><220> <221> VARIANTE <222> 9 <223> Xaa = cualquier aminoácido; o Xaa = cualquier aminoácido diferente a Leu; o Xaa = Phe, Trp o Tyr; o seleccionado de entre cualquier otro aminoácido aromático natural o no natural; o Xaa = Tyr</p>
35	<p><220> <221> VARIANTE <222> 19..21 <223> /sustituir=""</p>
40	<p><220> <221> VARIANTE <222> 20..21 <223> /sustituir=""</p>
45	<p><220> <221> VARIANTE <222> 20 <223> /sustituir="Asn" or "Glu" /nota="cuando xaa21 no se encuentra, entonces Xaa20 es Asn o Glu"</p>
50	<p><220></p>

<221> VARIANTE

<222> 21

<223> /sustituir="" /nota="cuando xaa21 no se encuentra, entonces Xaa20 es Asn o Glu"

5 <400> 66

<400> 66

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Xaa Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr Asp Phe
 20

10 <210> 67

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 67

Gln Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

20

<210> 68

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 68

Asn Thr Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly cys Tyr

30

<210> 69

<211> 19

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

40

<400> 69

Asn Leu Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

5 <210> 70
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <213> Péptido generado sintéticamente

10 <400>70
 Asn Ile Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

15 <210> 71
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <400> 71
 Asn Ser Ser Gln Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

25 <210> 72
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 30 <400> 72

Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly
 1 5 10 15
 Cys Tyr

35 <210> 73
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 40 <400> 73

Gln Ser Ser Gln Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

5 <210> 74
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10 <400> 74
 Ser Ser Gln Tyr Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly
 1 5 10 15
 Cys Tyr

15 <210> 75
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 75
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Ala Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

25 <210> 76
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 76
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

35 <210> 77
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 77

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Asn Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido generado sintéticamente

<400> 78

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Asp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

<210> 79

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 79

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Cys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 80

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Gln Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

<210> 81

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

- 62 -

<400> 81

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Glu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

5

<210> 82

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 82

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Gly Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

15

<210> 83

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 83

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu His Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

25

<210> 84

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

35

<400> 84

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

40

<210> 85

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

5

<400> 85

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

<210> 86

<211> 19

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

15

<400> 86

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Met Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

20

<210> 87

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> péptido generado sintéticamente

<400> 87

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

30

<210> 88

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> péptido generado sintéticamente

40

<400> 88

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Pro Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

- 5 <210> 89
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 10 <400> 89
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Ser Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr
- 15 <210> 90
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 20 <400> 90
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Thr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr
- 25 <210> 91
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 30 <400> 91
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr
- 35 <210> 92
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> péptido generado sintéticamente
- 40 <400> 92

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Cys Tyr

5 <210> 93
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 93
 Cys Cys Glu Ala Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

15 <210> 94
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 94
 Cys Cys Glu Arg Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

25 <210> 95
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 95
 Cys Cys Glu Asn Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

35 <210> 96
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 96

Cys Cys Glu Asp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

5 <210> 97
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 97
 Cys Cys Glu Cys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

15 <210> 98
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido generado sintéticamente

<400> 98
 Cys Cys Glu Gln Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

25 <210> 99
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 99
 Cys Cys Glu Glu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

35 <210> 100
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 100

Cys Cys Glu Gly Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 101

Cys Cys Glu His Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

<210> 102

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 102

Cys Cys Glu Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

<210> 103

20 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 103

Cys Cys Glu Lys Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

30

<210> 104

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 104

Cys Cys Glu Met Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

40

<210> 105

- 68 -

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 105
 Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

10 <210> 106
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 106
 Cys Cys Glu Pro Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

20 <210> 107
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> péptido generado sintéticamente

<400> 107
 Cys Cys Glu Ser Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

30 <210> 108
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 108
 Cys Cys Glu Thr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

40 <210> 109
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

5

<400> 109

Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

<210> 110

10

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 110

Cys Cys Glu Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
 1 5 10

20

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 111

Gln His Asn Pro Arg
 1 5

30

<210> 112

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 112

Val Gln His Asn Pro Arg
 1 5

40

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

5

<400> 113

Val Arg Gln His Asn Pro Arg
1 5

<210> 114

10

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 114

Val Arg Gly Gln His Asn Pro Arg
1 5

20

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 115

Val Arg Gly Pro Gln His Asn Pro Arg
1 5

30

<210> 116

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 116

Val Arg Gly Pro Arg Gln His Asn Pro Arg
1 5 10

40

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

- 71 -

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 117

Val Arg Gly Pro Arg Arg Gln His Asn Pro Arg
 1 5 10

5

<210> 118

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 118

Arg Gln His Asn Pro Arg
 1 5

15

<210> 119

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<220>

25

<221> VARIANTE

<222> 1..4

<223> /sustituir="" /nota="cuando xaa1 a xaa4 no se encuentra, entonces xaa5 es cualquier aminoácido"

30

<220>

<221> VARIANTE

<222> 5

<223> /sustituir="cualquier aminoácido" / nota="cuando xaa1 a xaa4 no se encuentra, entonces xaa5 es cualquier aminoácido"

35

<220>

<221> VARIANTE

<222> 1..5

<223> /sustituir=""

40

<220>

<221> VARIANTE

<222> 8, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21

<223> Xaa = cualquier aminoácido

45

<400> 119

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 1 5 10 15
 Xaa Cys xaa Xaa Xaa
 20

- 5
 - <220>
 - <223> péptido generado sintéticamente
 - <220>
 - <221> VARIANTE
 - <222> 4
 - <223> Xaa = Leu, Ile, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe
- 10
 - <220>
 - <221> VARIANTE
 - <222> 11
 - <223> Xaa = Thr, Ala, Lys, Arg o Trp; o Xaa = cualquier aminoácido; o Xaa = Thr, Ala, Lys, Arg o Trp; o Xaa = cualquier aminoácido no aromático
- 15
 - <220>
 - <221> VARIANTE
 - <222> 14
 - <223> Xaa = Tyr o Leu
- 20
 - <220>
 - <221> VARIANTE
 - <222> 15..16
 - <223> /sustituir=""
- 25
 - <400> 120
- 30
 - Cys Cys Glu Xaa Cys Cys Asn Pro Ala Cys Xaa Gly Cys Xaa Asp Phe
 1 5 10 15
 - <212> PRT
 - <213> Secuencia artificial
- 35
 - <220>
 - <223> Péptido generado sintéticamente
 - <220>
 - <221> VARIANTE
 - <222> 1..4
 - <223> /sustituir="" / nota="cuando Xaa1 a Xaa4 no se encuentra, entonces Xaa5 es Asn"
- 40
 - <220>
 - <221> VARIANTE
 - <222> 5
 - <223> /sustituir="Asn" / nota="cuando Xaa1 a Xaa4 no se encuentra, entonces Xaa5 es Asn"
- 45
 - <220>
 - <221> VARIANTE
 - <222> 1..5

- <223> /sustituir=""
- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> 8
<223> Xaa = Glu o Asp
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> 9
<223> Xaa = Leu, Ile, Val, Trp, Tyr o Phe
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> 16
<223> Xaa = Thr, Ala o Trp
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> 19
<223> Xaa = Trp, Tyr o Leu
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> 19
<223> /sustituir=""
- 30 <400> 121

Asn	Ser	Ser	Asn	Tyr	Cys	Cys	Xaa	Xaa	Cys	Cys	Asn	Pro	Ala	Cys	Xaa
1				5					10					15	
Gly	Cys	Xaa	Asp	Phe											
			20												
- 30 <210> 122
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Péptido generado sintéticamente
<220>
<221> VARIANTE
<222> 1..4
- 40 <223> /sustituir="" /nota="cuando Xaa1 a Xaa4 no se encuentra, entonces Xaa5 es Asn, Trp, Tyr, Asp, Ile, Thr o Phe"
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> 5
<223> /sustituir="Asn", "Trp", "Asp", "Ile", "Thr" o "Phe" /nota="Cuando Xaa1 a Xaa4 no se encuentra, entonces Xaa5 es Asn, Trp, Tyr, Asp, Ile, Thr o Phe"

- 5 <220>
<221> VARIANTE
<222> 1..5
<223> /sustituir=""
- 10 <220>
<221> VARIANTE
<222> 8
<223> Xaa = Glu, Asp, Gln, Gly o Pro
- 15 <220>
<221> VARIANTE
<222> 9
<223> Xaa = Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe
- 20 <220>
<221> VARIANTE
<222> 12
<223> Xaa = Asn, Tyr, Asp or Ala
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> 13
<223> Xaa = Pro or Gly
- 30 <220>
<221> VARIANTE
<222> 14
<223> Xaa = Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg o Asp
- 35 <220>
<221> VARIANTE
<222> 16
<223> Xaa = Thr, Ala, Asn, Lys, Arg o Trp
- 40 <220>
<221> VARIANTE
<222> 17
<223> Xaa = Gly, Pro or Ala
- 45 <220>
<221> VARIANTE
<222> 19
<223> Xaa = Trp, Tyr, Phe or Leu; o Xaa = Lys o Arg
- 50 <220>
<221> VARIANTE
<222> 19..21
<223> /sustituir=""

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 20..21
 <223> /sustituir=""

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 20
 <223> /sustituir="Asn" o "Glu" /nota="cuando Xaa21 no se encuentra, entonces Xaa20 es Asn o Glu"

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 21
 <223> /sustituir="" /nota="cuando Xaa21 no se encuentra, entonces Xaa20 es Asn o Glu"

<400> 122
 Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
 1 5 10 15

Xaa Cys Xaa Asp Phe
 20 20

<210> 123
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

30 <400> 123
 Asn Ser Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 124
 <211> 30
 <212> PRT
 35 <213> Yersinia enterocolitica

<400> 124
 Glu Ala Cys Asp Pro Pro Leu Pro Pro Ala Glu Val Ser Ser Asp Trp
 1 5 10 15
 Asp Cys Cys Asp Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
 20 25 30

Reivindicaciones

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende:
- (a) un polipéptido seleccionado de entre:
- (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:
- 10 Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;
- (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:
- 15 Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr; y
- (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:
- Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;
- 20 (b) un agente seleccionado de entre:
- (i) un inhibidor de bomba de protones;
- (ii) un agonista de receptor de H₂;
- 25 (iii) un antagonista de receptor de opioides; y
- (iv) un agonista de receptor de opioides; y
- (c) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el agonista de receptor de opioides es el fentanilo o la morfina.
- 35 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.
- 40 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido está esencialmente constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.
- 45 5. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido está constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.
- 50 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

5 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido está esencialmente constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

10 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido está constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

15 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

20 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido está esencialmente constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

25 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido está constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

30 12. Procedimiento para la producción de un polipéptido seleccionado de entre:

(i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;

35 (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr; y

(iii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

40 Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;

comprendiendo el procedimiento:

45 (a) sintetizar químicamente el polipéptido; y

(b) purificar el polipéptido sintetizado químicamente.

50 13. Procedimiento para la producción de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido seleccionado de entre:

(i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;

5 (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr; y

10 (iii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;

comprendiendo el procedimiento:

15 (a) sintetizar químicamente el polipéptido;

(b) purificar el polipéptido sintetizado químicamente; y

(c) mezclar el polipéptido purificado con un portador farmacéuticamente aceptable.

20 14. Procedimiento para la producción de un polipéptido seleccionado de entre:

(i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;

25 (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr; y

30 (iii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;

comprendiendo el procedimiento:

35 (a) proporcionar una célula que aloja una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido;

(b) cultivar la célula en condiciones en las que el polipéptido es expresado; y

(c) aislar el polipéptido expresado.

40 15. Procedimiento para la producción de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido seleccionado de entre:

45 (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;

50 (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr; y

(iii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

5 Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr;

comprendiendo el procedimiento:

- 10 (a) proporcionar una célula que aloja una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido;
(b) cultivar la célula en condiciones en las que el polipéptido es expresado;
(c) aislar el polipéptido expresado; y
(d) mezclar el polipéptido aislado con un portador farmacéuticamente aceptable.

15 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

20 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el polipéptido está esencialmente constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

25 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el polipéptido está constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Phe Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

30 19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

35 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el polipéptido está esencialmente constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

40 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el polipéptido está constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

45
22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

50

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el polipéptido está esencialmente constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

5

24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el polipéptido está constituido por la secuencia de aminoácidos: Cys Cys Glu Trp Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr.

10

25. Péptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos (I): Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ Cys₆ Cys₇ Xaa₈ Xaa₉ Cys₁₀ Cys₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Cys₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys₁₈ Xaa₁₉ Xaa₂₀ Xaa₂₁, en la que: Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ Xaa₅ es Asn Ser Ser Asn Tyr o no se encuentra o Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Xaa₄ no se encuentra.

15

26. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₅ es Asn, Trp, Tyr, Asp, o Phe.

20

27. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₅ es Thr o Ile.

25

28. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₅ es Tyr, Asp o Trp.

29. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₈ es Glu, Asp, Gln, Gly o Pro.

30

30. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₈ es Leu, Ile, Val, Ala, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe.

35

31. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₉ es Leu, Ile, Val, Lys, Arg, Trp, Tyr o Phe.

40

32. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₁₂ es Asn, Tyr, Asp o Ala.

45

33. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₁₃ es Asn, Tyr, Asp o Ala.

34. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₁₄ es Ala, Leu, Ser, Gly, Val, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, Arg, o Asp.

50

35. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₁₆ es Thr, Ala, Asn, Lys, Arg, o Trp.

5

36. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₁₇ es Gly, Pro o Ala.

10

37. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₁₉ es Trp, Tyr, Phe, Asn o Leu.

38. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₁₉ es Lys o Arg.

15

39. Péptido purificado según la reivindicación 25, en el que Xaa₂₀ Xaa₂₁ es AspPhe o Xaa₂₀ es Asn o Gly y Xaa₂₁ no se encuentra.

20

- - -

Figura 1a. Análisis LCMS de variantes del péptido recombinante

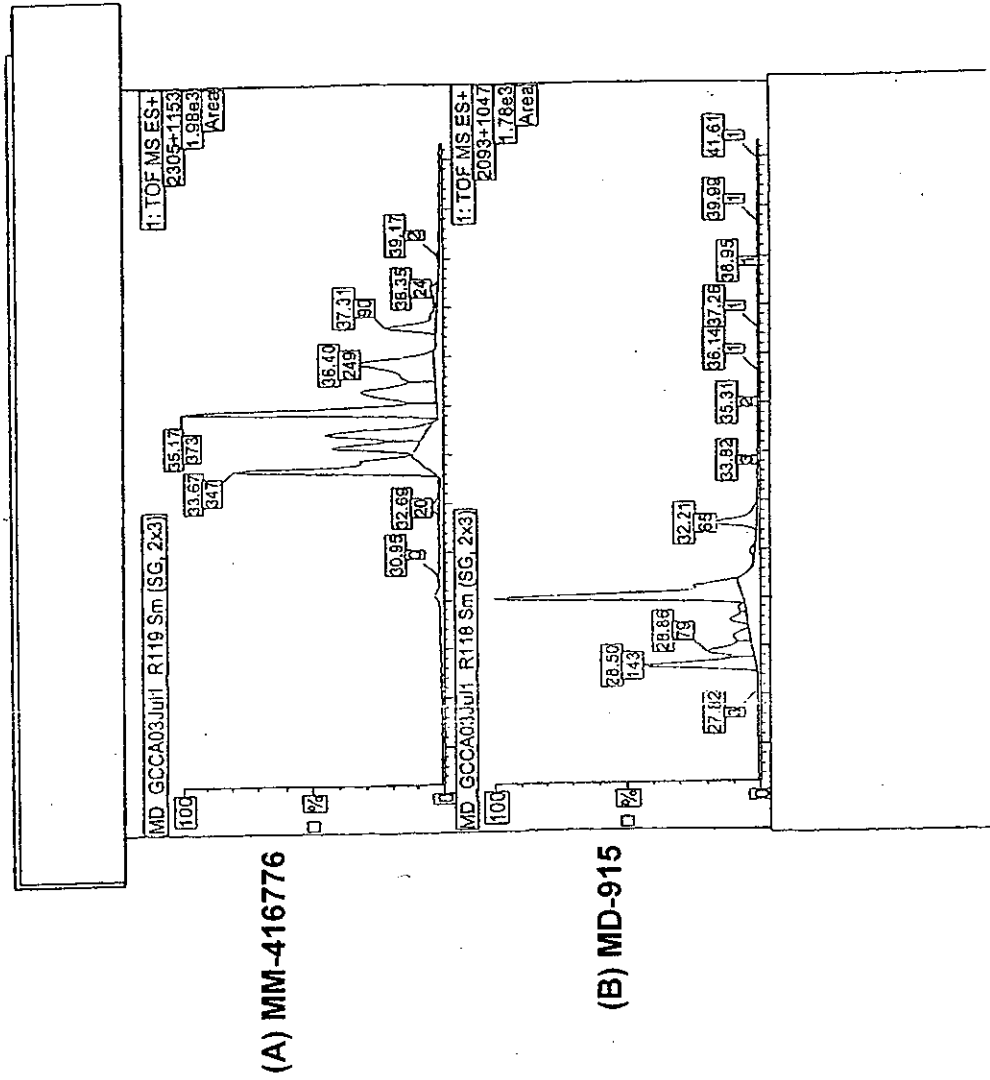


Figura 1b. Análisis por LCMS de MD-1100 sintético
(Cromatografía iónica total (TIC))

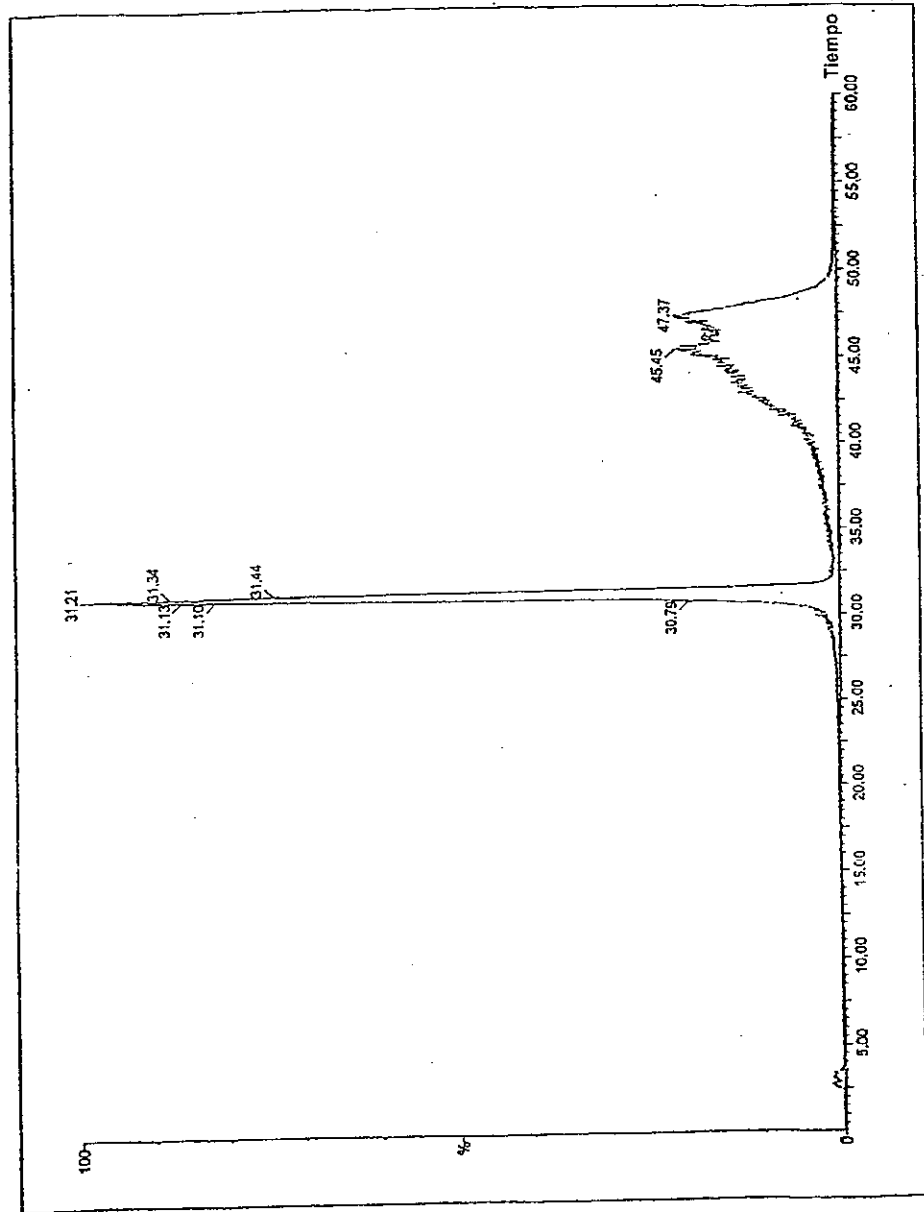


Figura 1c. Análisis por LCMS (cromatografía iónica total del blanco en el análisis de MD-1100)

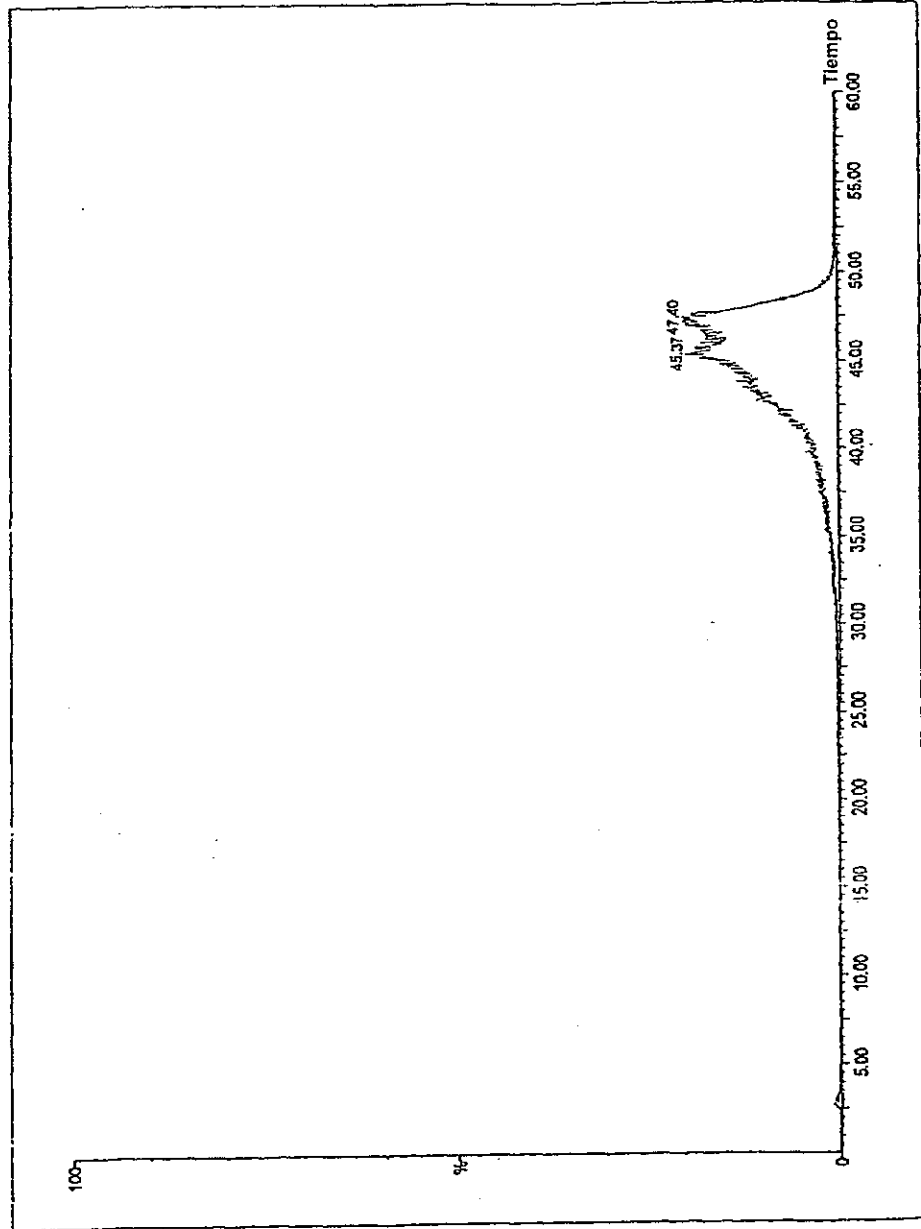


Figura 2. Péptidos sintetizados por vía química en el ensayo de actividad del receptor GC-C intestinal

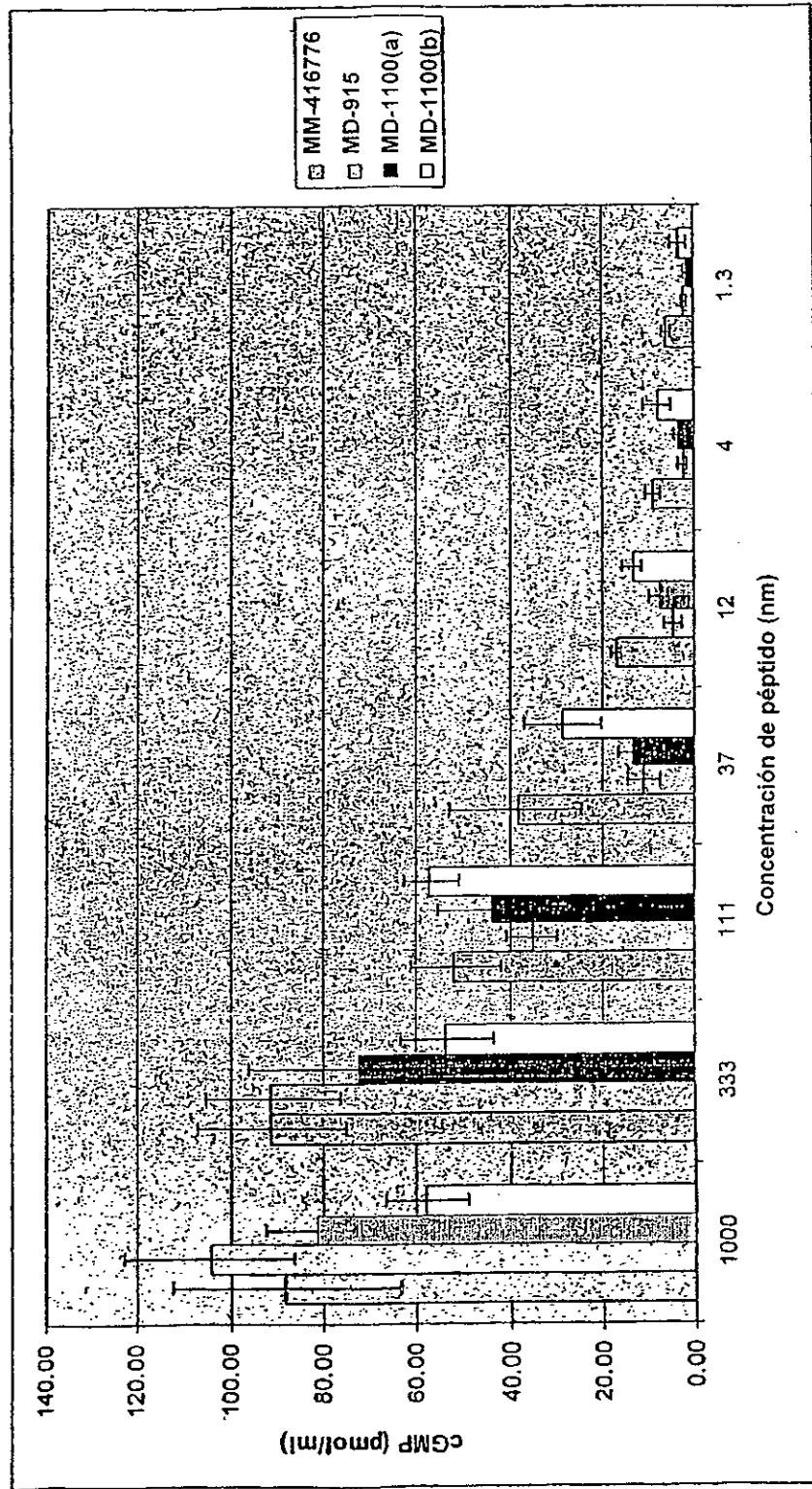


Figura 3a. MM-416776 frente a Zelnorm® en un modelo de tránsito gastrointestinal (GIT) agudo de ratón

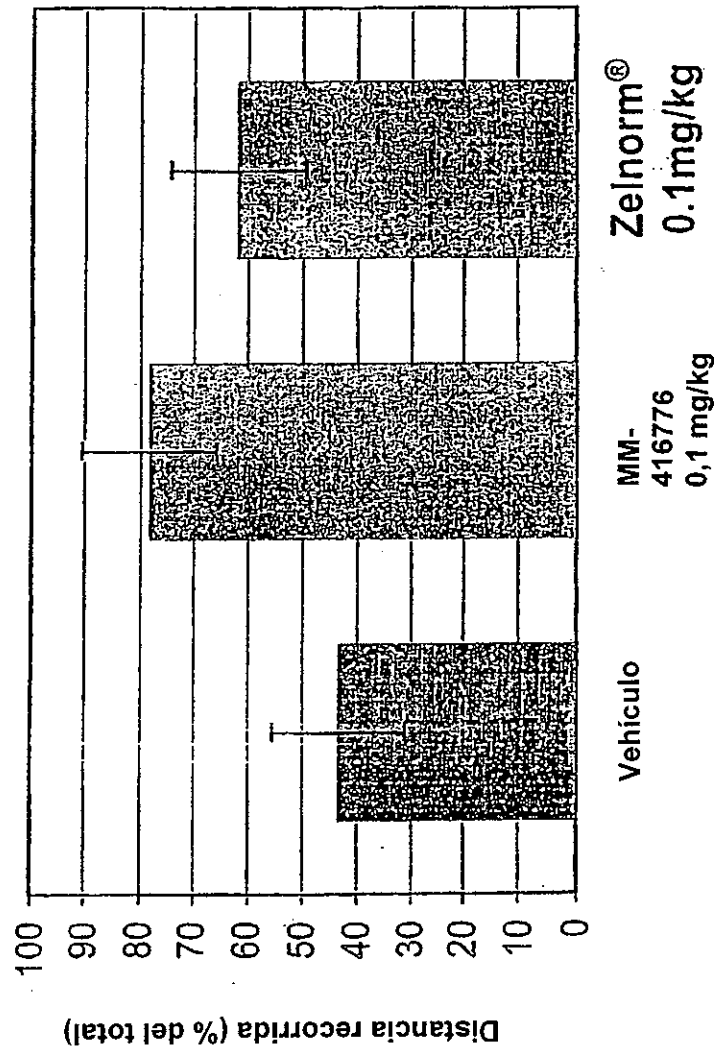


Figura 3B. MD-1100 frente a Zeinorm® en un modelo de tránsito gastrointestinal agudo de ratón

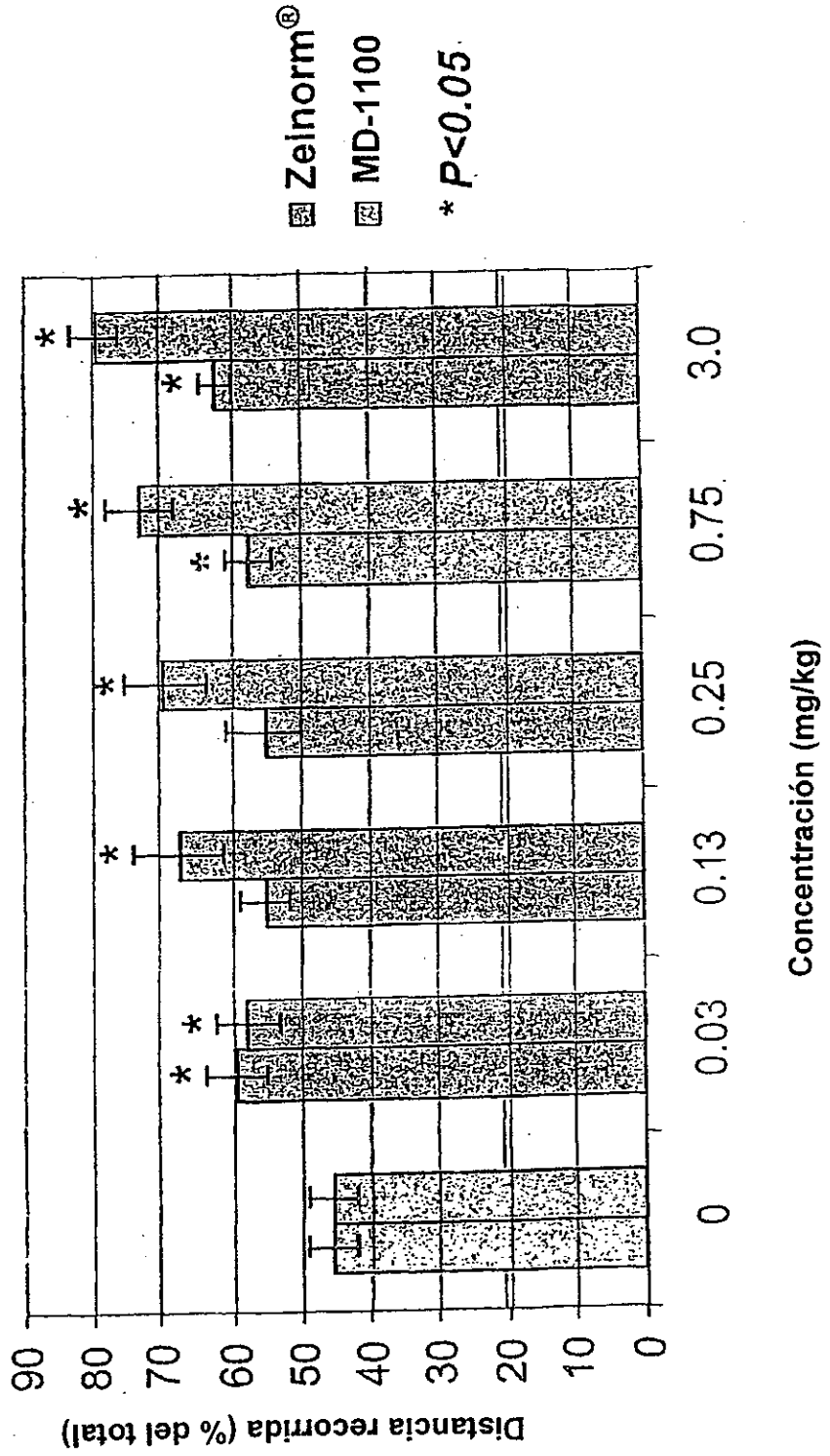


Figura 4a. MD-915 y MM-41677 purificados en el modelo GIT

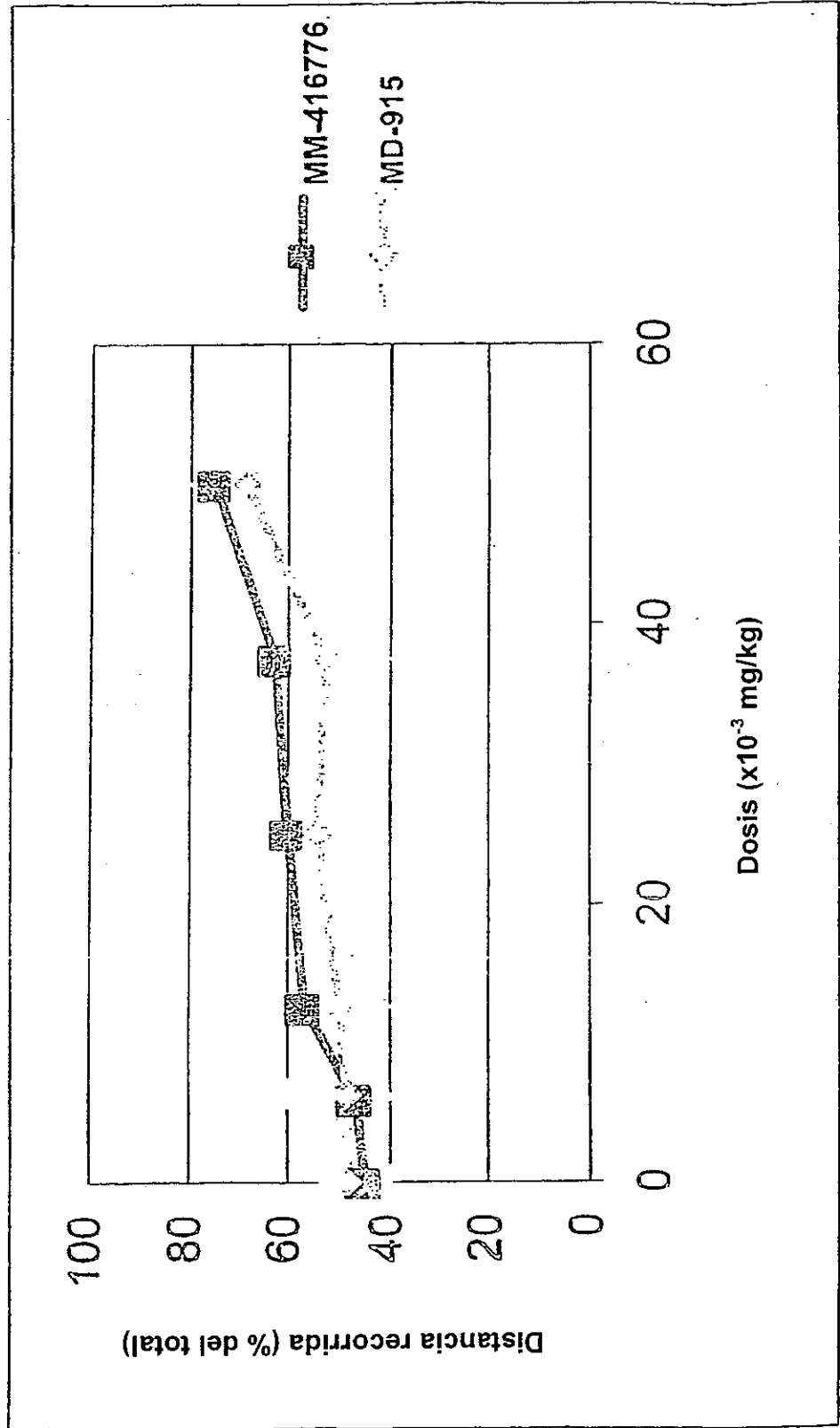


Figura 4b. Péptidos sintetizados por vía química en el modelo GIT

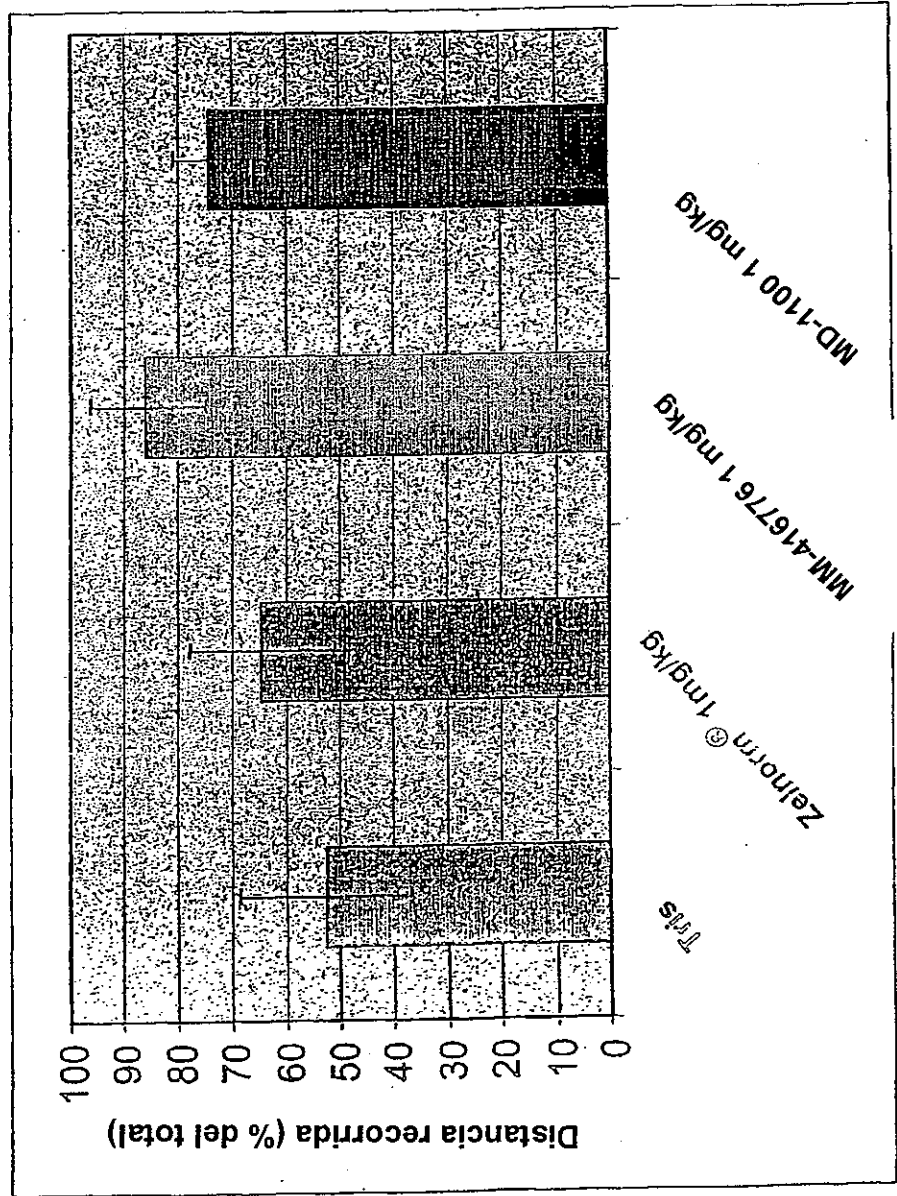


Figura 4c. Dosificación crónica frente a aguda en el ensayo de GIT

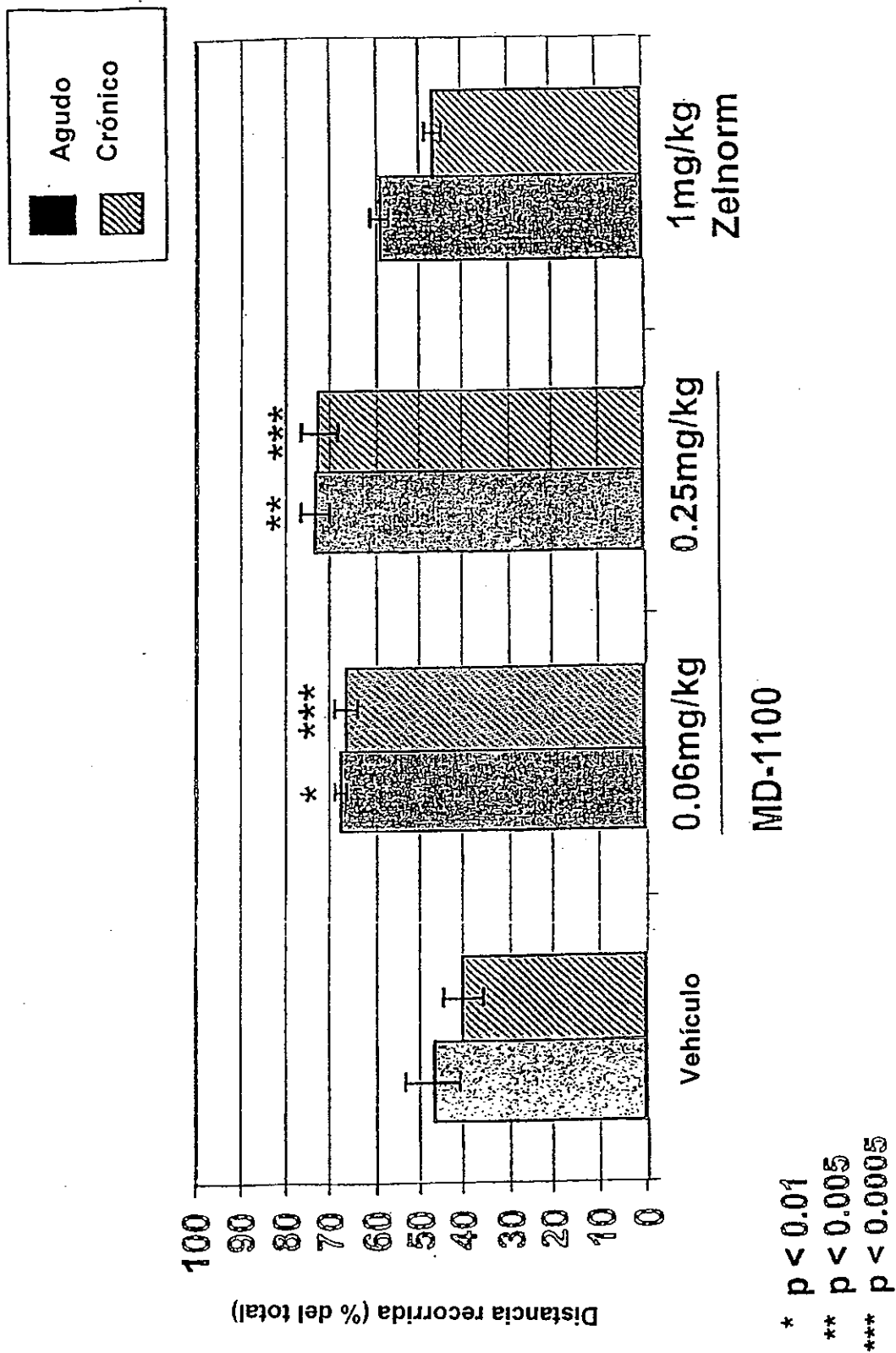
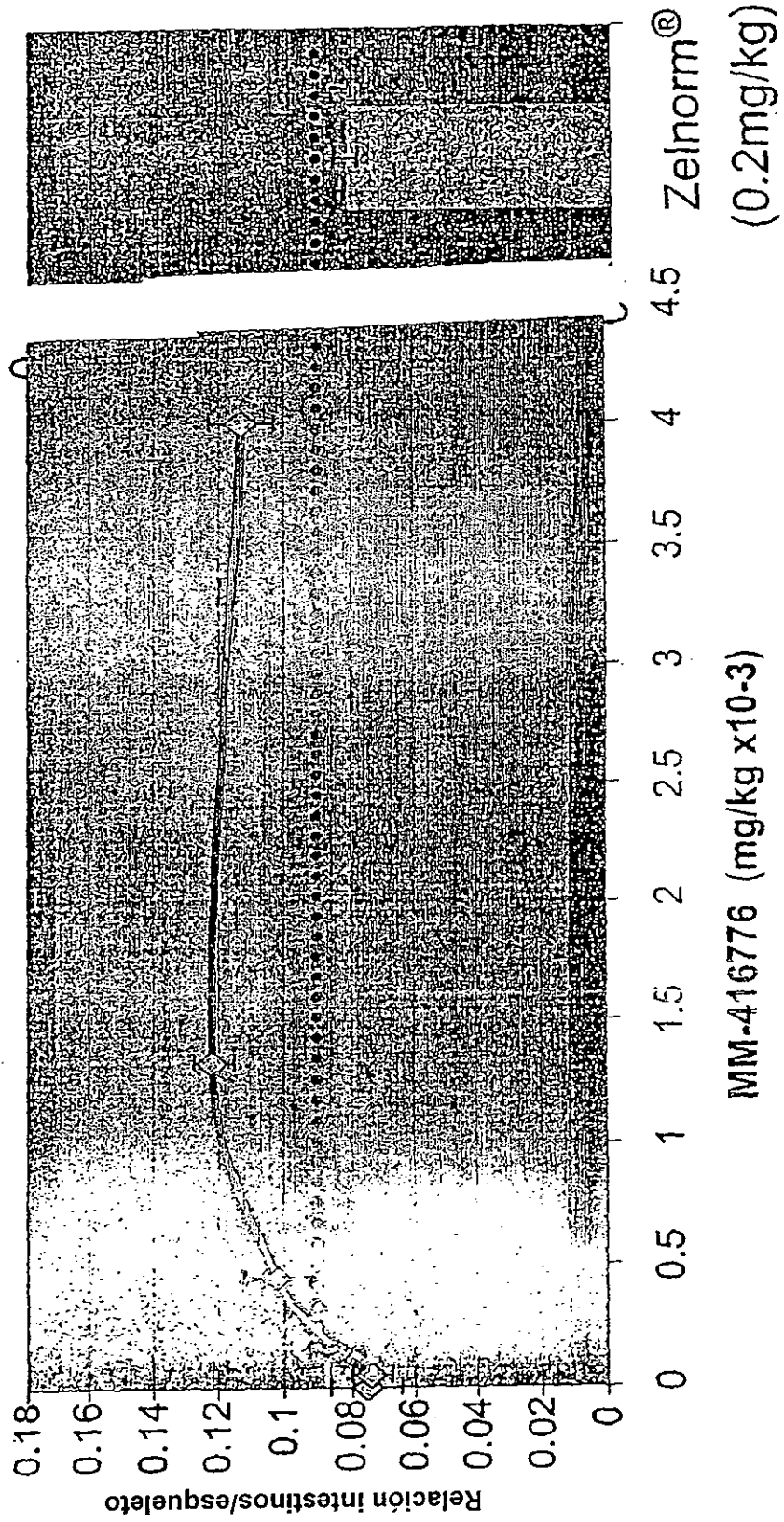


Figura 5a. MM-416776 frente a Zelnorm® en un modelo de secreción intestinal de ratón.



11/19

Figura 5b. MD-1100 frente a Zelnorm® en un modelo de secreción intestinal de ratón.

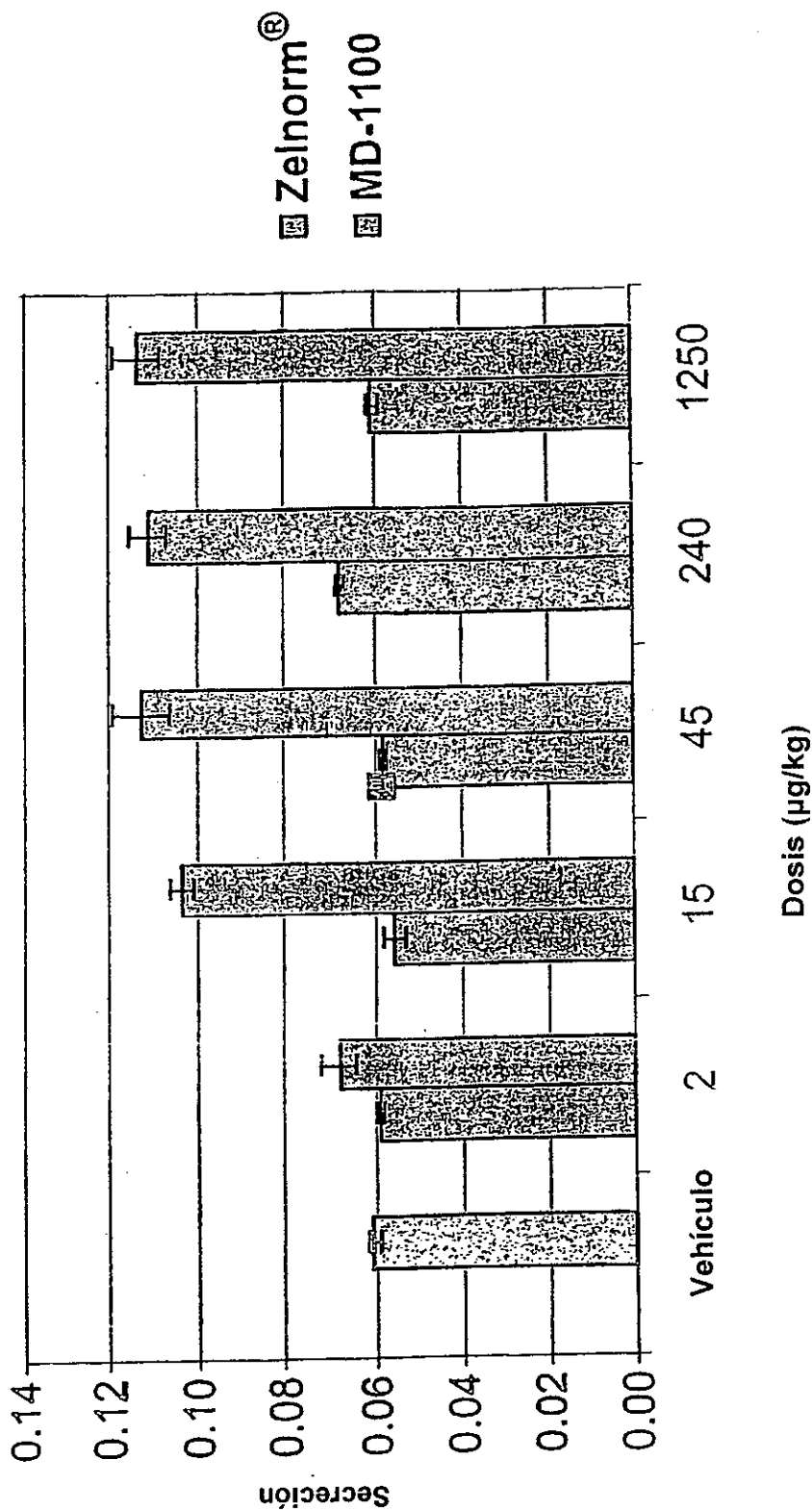


Figura 6a. MD-915 y MM-416776 generados de manera recombinante en el modelo de secreción intestinal de ratón

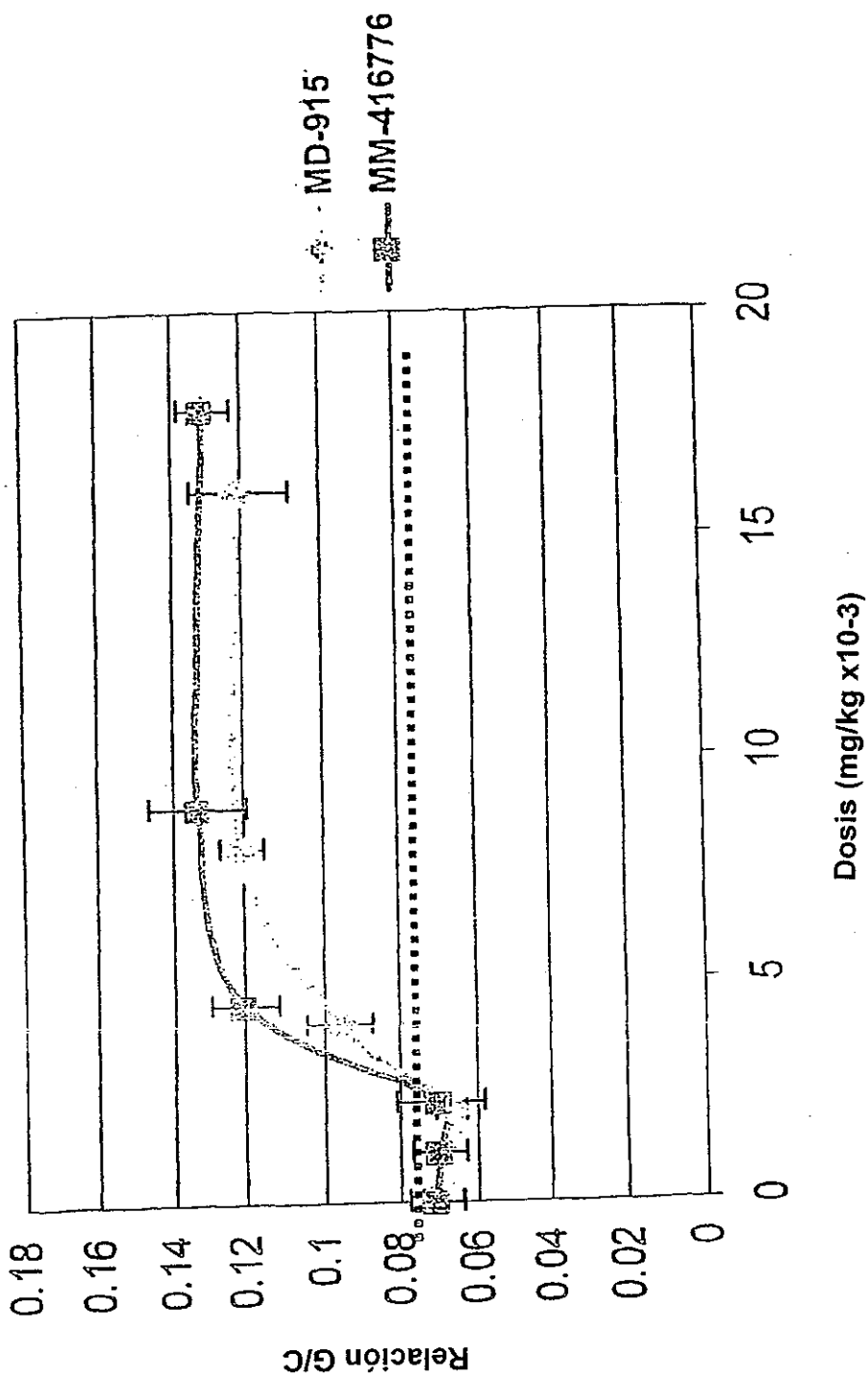


FIGURA 6b. Péptidos sintetizados químicamente en roedores modelo de secreción intestinal

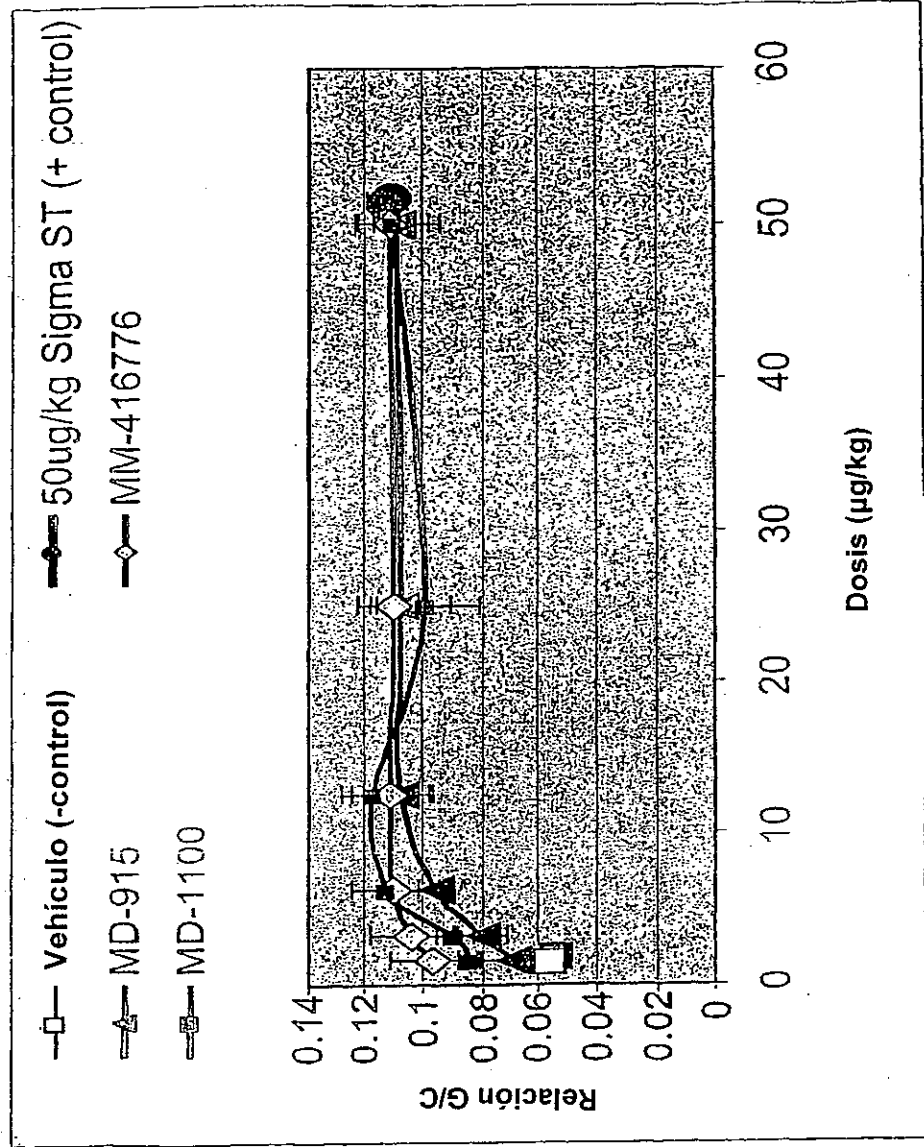
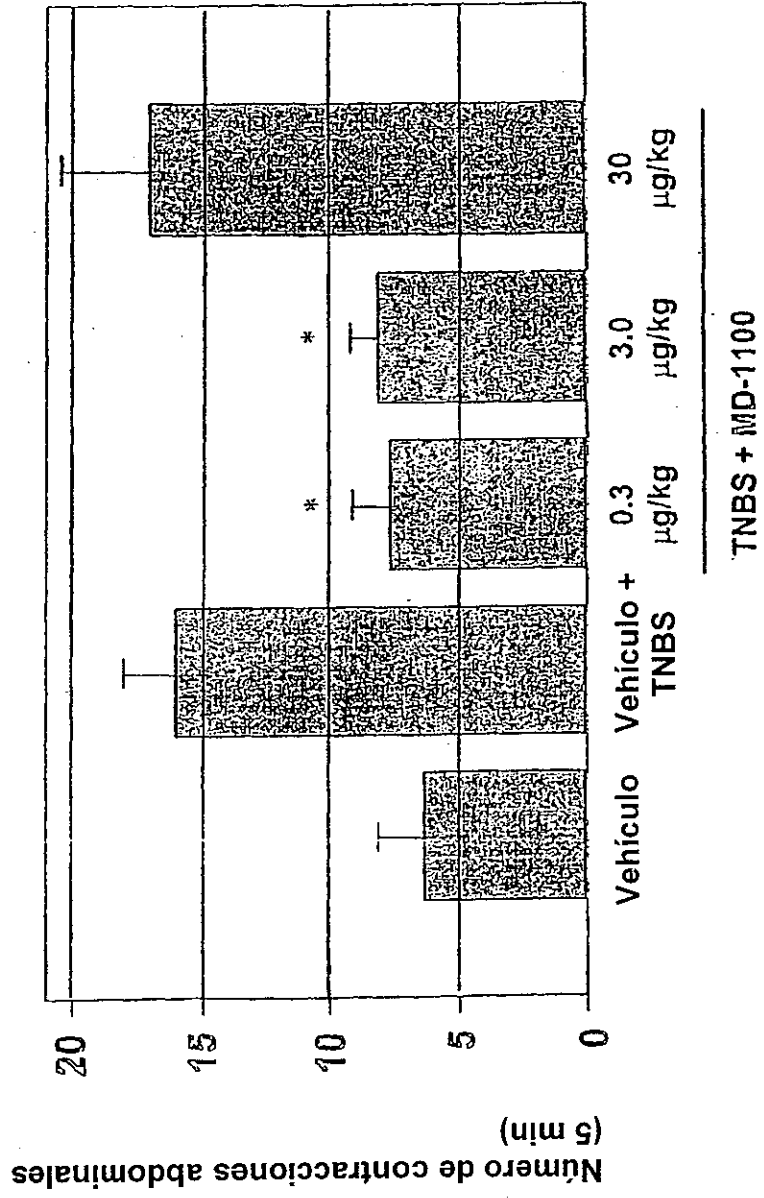


Figura 7. Efecto de MD-1100 sobre el dolor en un ensayo de dilatación colorrectal de TNBS en rata



*p<0,05 en comparación con el valor del "vehículo"

Figura 8a. Efectos antinociceptivos viscerales de MD-915 en un ensayo de contorsiones en ratón

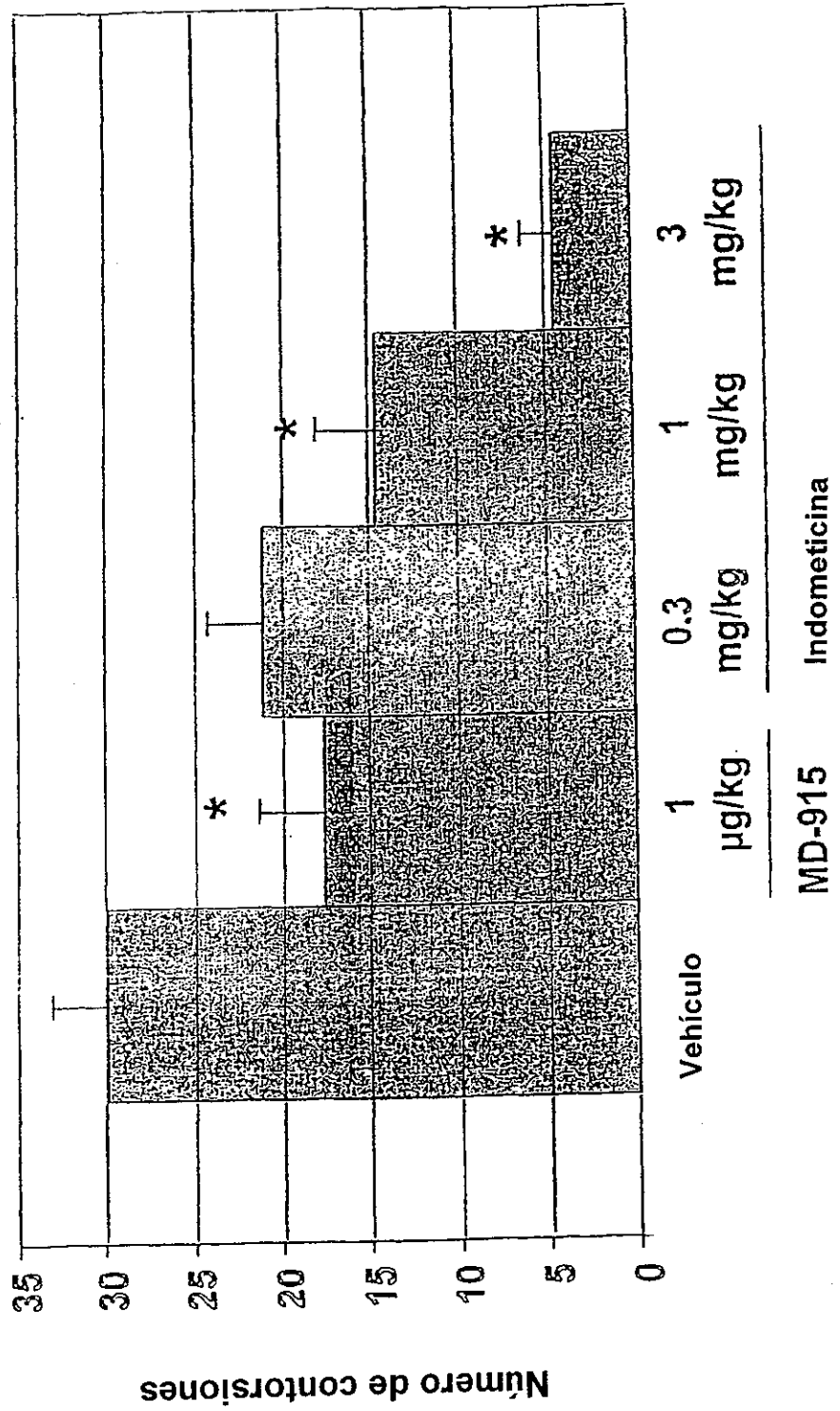


Figura 8b. Efectos antinociceptivos viscerales de MD-1100 en un ensayo de contorsiones en ratón

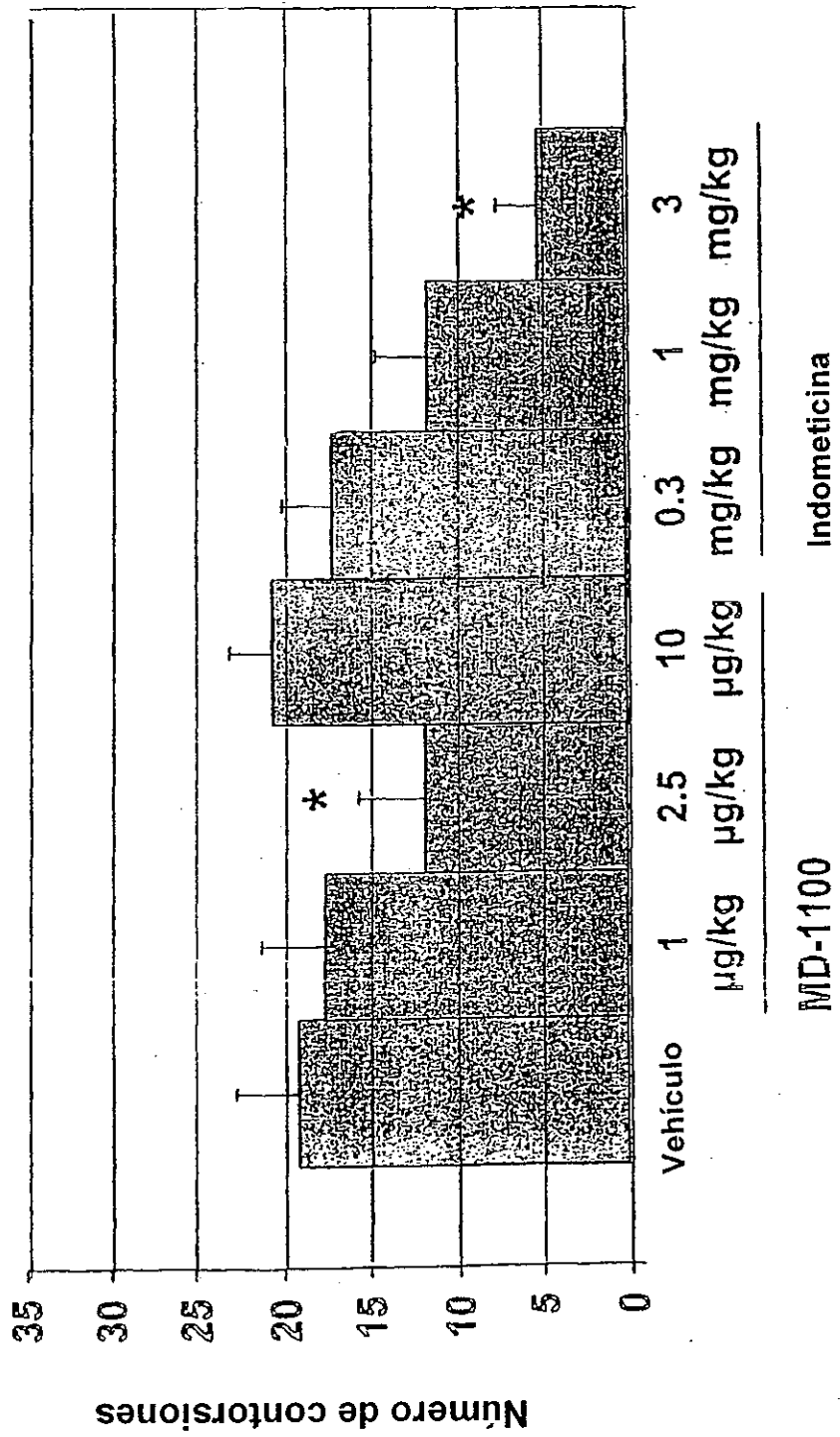


Figura 9. Unión competitiva del radioligando de MD-1100

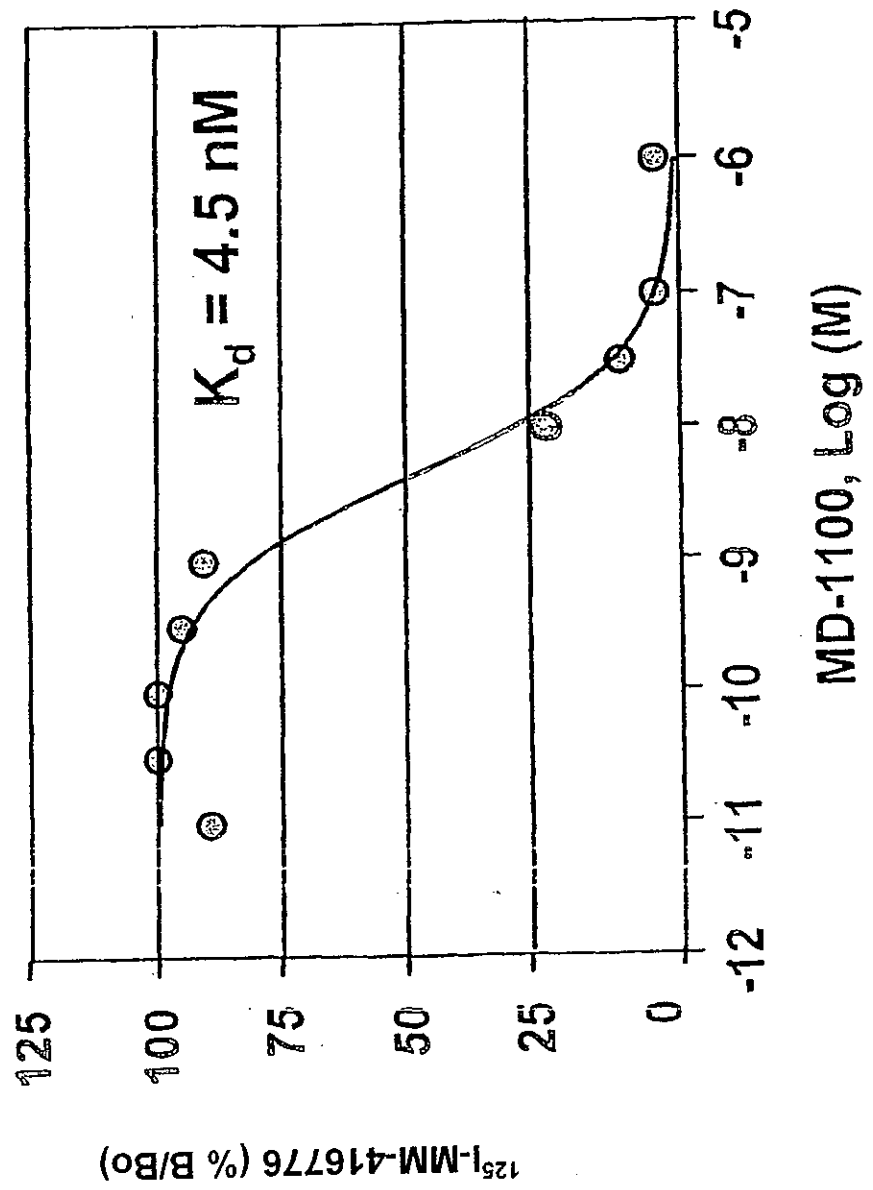
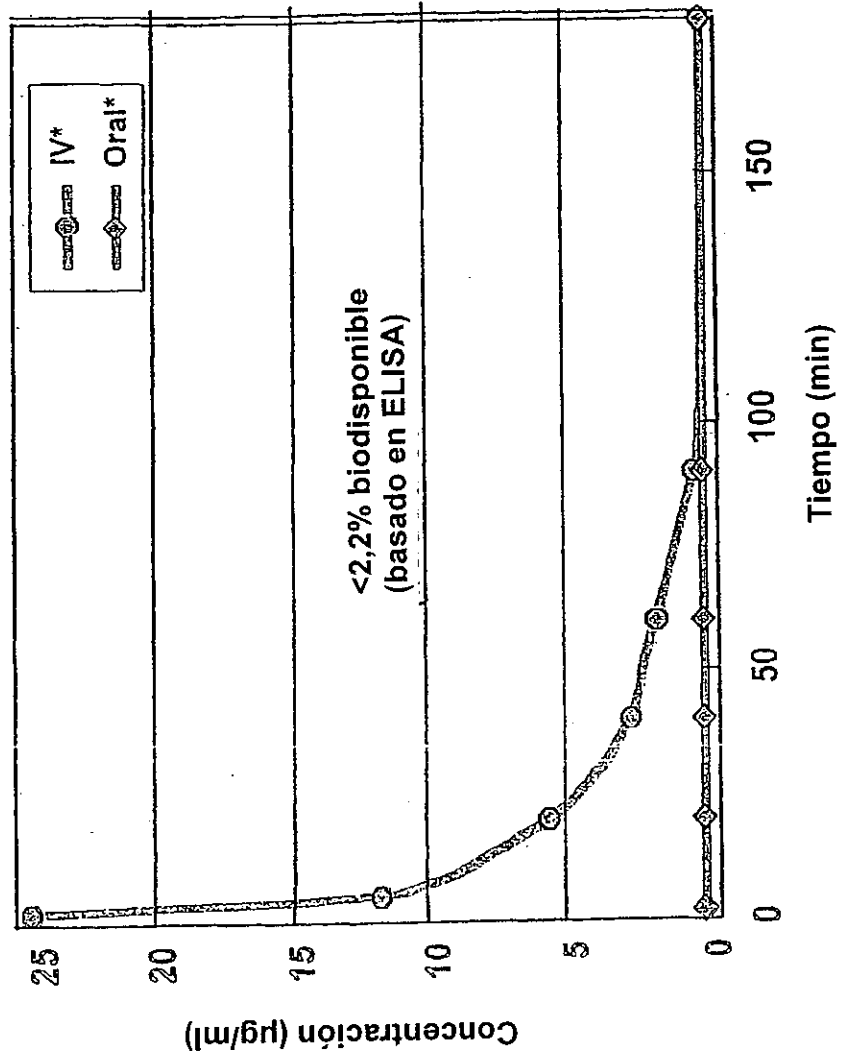
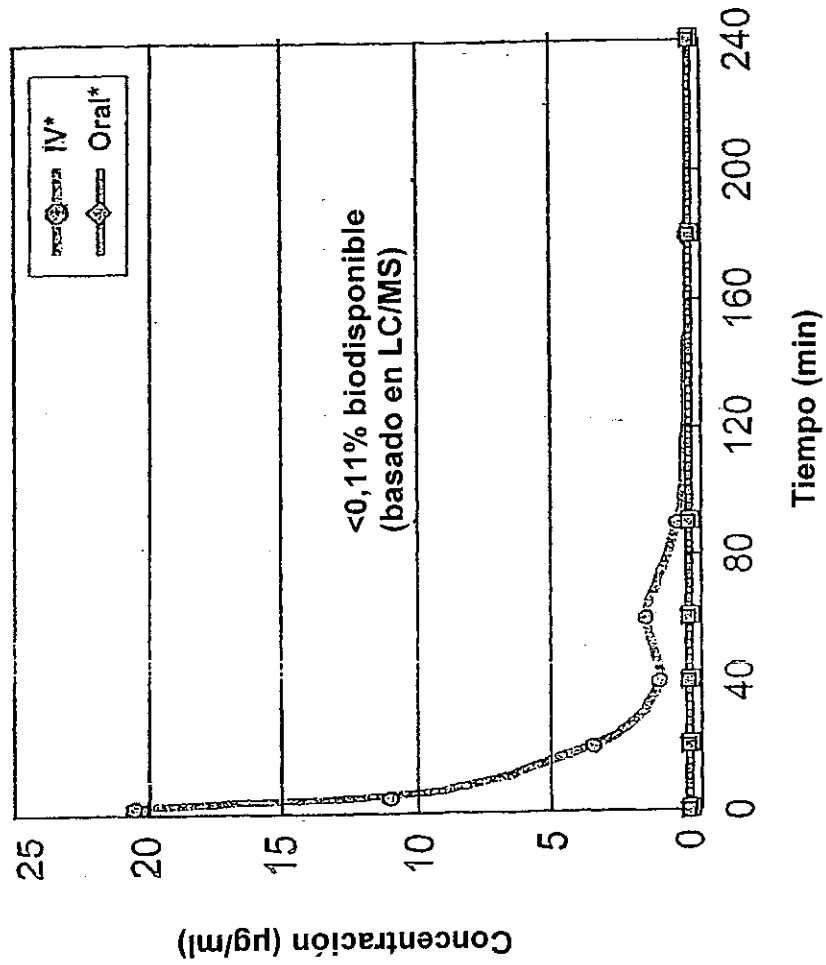


Figura 10a. Absorción general mínima de MD-1100 (basada en ELISA)



* límite de detección 0,061 µg/ml (40 nM)
 Dosificación a 10 mg/kg

Figura 10b. Absorción general mínima de MD-1100 (basada en LC/MS)



* límite de detección 0,00063 µg/ml (0,6 nM)

* Dosificación a 10 mg/kg